



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS  
RECOMBINANTES DERIVADOS DE *Moringa oleífera* Lam. Y**

*Enterococcus sp.*

TESIS QUE PRESENTA

**JESÚS JOSAFATH QUEZADA RIVERA**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

COMITÉ TUTORAL

**Dr. José Francisco Morales Domínguez**

**Dra. Ruth Elena Soria Guerra**

**Dra. Nora Lilia Vasco Méndez**

**Aguascalientes, Ags. Noviembre de 2018**



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

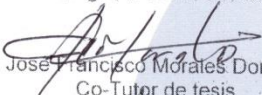
M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
P R E S E N T E


Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **JESÚS JOSAFATH QUEZADA RIVERA** con ID 200518 quien realizó la tesis titulado: **OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS RECOMBINANTES DERIVADOS DE *Moringa oleifera* Lam. Y *Enterococcus sp.***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

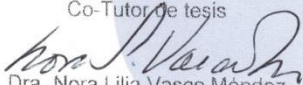
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 19 de noviembre de 2018.

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Co-Tutor de tesis

  
Dra. Ruth Elena Soria Guerra  
Co-Tutor de tesis

  
Dra. Nora Lilia Vasco Méndez  
Asesora

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

JESUS JOSAFATH QUEZADA RIVERA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**OBTENCIÓN DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS RECOMBINANTES DERIVADOS DE *Moringa oleífera* Lam. Y *Enterococcus sp.***", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 20 de noviembre de 2018

*"Se lumen proferre"*

**EL DECANO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO

Article Processing Charge Notice



Participants

Becky Liu (becky\_liu)

José Francisco Morales Domínguez (francisco10)

Messages

Note

From

Dear José Francisco Morales-Domínguez,

becky\_liu  
Oct 18

We are pleased to inform you that your submission (***Heterologous expression of bacteriocin E-760 in Chlamydomonas reinhardtii and functional analysis***) to PHYTON, International Journal of Experimental Botany is accepted.

All articles in PHYTON, International Journal of Experimental Botany (ISSN: 1851-5657) are published in printed and online version. Authors are asked to pay an article processing charge (APC) of 1000 US dollars per processed paper. Rejected articles are free of charge. There are no surcharges based on the length of an article, figures or supplementary data.

The APC of your article is: \$1000USD.

The invoice of your submission is enclosed.

Total payment due in 10 days.

When you send an outgoing payment by wire transfer, you need to choose OUR code. The OUR instruction means you pay all transfer charges, we receive all your payment.

Please include the invoice number on the reference of your payment.

Please let us know the Transaction Number and send the proof of payment.

Should you have any questions, please feel free to contact us.

Thank you very much.

Yours Sincerely,

Invoice Department,

871 Coronado Center Drive, Suite 200,

Henderson, Nevada, 89052, USA

Tel: +1 702 673 0457

Fax: +1 844 635 2598

Website: [www.techscience.com](http://www.techscience.com)

becky\_liu, Copyeditor, Phytion 201810184549.pdf

1 **Heterologous expression of bacteriocin E-760 in *Chlamydomonas reinhardtii* and**  
 2 **functional analysis.**

3 **Expresión Heteróloga de la bacteriocina E-760 en *Chlamydomonas reinhardtii* y**  
 4 **análisis funcional.**

5

6 Jesús Josafath Quezada-Rivera. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

7 Ruth Elena Soria-Guerra. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

8 Frida Sahori Pérez-Juárez. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

9 Luzmila Martínez-González. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

10 Silvia Edith Valdés-Rodríguez. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
 11 Instituto Politécnico Nacional.

12 Nora Lilia Vasco-Méndez. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

13 José Francisco Morales-Domínguez. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

14

15 Universidad Autónoma de Aguascalientes: Departamento de Química. Av. Universidad No. 940, Ciudad  
 16 Universitaria, C.P. 20131; Aguascalientes, Ags. México. Tel. 052 449 9107400 ext. 8420.

17 Universidad Autónoma de San Luis Potosí: Facultad de Ciencias Químicas. Dr. Manuel Nava No. 8, Zona  
 18 Universitaria Poniente, C.P. 78290; San Luis Potosí, S.L.P., México.

19 Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional: Departamento de  
 20 Biotecnología y Bioquímica. Cinvestav-Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León  
 21 36824 Irapuato, Gto., México.

22 Expression of bacteriocin E-760 in *C. reinhardtii*

23 Number of figures: 8

24 Address Correspondence to: José Francisco Morales Domínguez. Av. Universidad No. 940, Ciudad  
 25 Universitaria, C.P. 20131; Aguascalientes, Ags., México. Tel. 052 449 9107400 ext. 8420. E-mail:  
 26 jfmoral@correo.uaa.mx

27

28

29

30

31

32

33

34

35 **ABSTRACT**

36

37 The use of antimicrobial peptides (AMPs) synthesized by bacteria (bacteriocins) is an  
38 alternative for combating multidrug resistant bacterial strains and their production by  
39 recombinant route is a viable option for their mass production. The bacteriocin E-760  
40 isolated from the genus *Enterococcus* sp. has been shown to possess inhibitory activity  
41 against Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this study, the expression of a  
42 chimeric protein coding for E-760 in the nucleus of *C. reinhardtii* was evaluated, as well  
43 as, its antibacterial activity. The synthetic gene E-760S was inserted into the genome of *C.*  
44 *reinhardtii* using *Agrobacterium tumefaciens*. A transgenic line was identified in TAP  
45 medium with hygromycin and by PCR. The increment in the culture medium temperature  
46 of the transgenic strain at 35 °C for 10 min, increased the production level of the  
47 recombinant protein from 0.14 (uninduced culture) to 0.36% of total soluble proteins  
48 (TSP); this was quantified by an ELISA assay. Recombinant E-760 possesses activity  
49 against *Staphylococcus aureus* in 0.34 U log, *Staphylococcus agalactiae* in 0.48 U log,  
50 *Enterococcus faecium* in 0.36 U log, *Pseudomonas aeruginosa* in 2 U log and for  
51 *Klebsiella pneumoniae*, the activity was 0.07 U log. These results demonstrate that the  
52 nucleus transformation of *C. reinhardtii* can function as a stable expression platform for the  
53 production of the synthetic gene E-760 and it can potentially be used as an antibacterial  
54 agent.

55

56 Key words: Heterologous expression; Antibacterial activity; Bacteriocin E-760;  
57 *Chlamydomonas reinhardtii*; Log inactivation; Nuclear transformation.

58

59

60

61

62

63

64



65

66 **RESUMEN**

67

68 El uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) sintetizados por bacterias (bacteriocinas) es  
69 una alternativa para el combate de cepas bacterianas multidrogo resistentes y su producción  
70 por vía recombinante es una opción viable para su obtención de forma masiva. La  
71 bacteriocina E-760 aislada del género *Enterococcus* sp. ha demostrado tener actividad  
72 inhibitoria contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. En este estudio se evaluó la  
73 expresión de una proteína quimérica codificante para E-760 en el núcleo de *C. reinhardtii*,  
74 así como su actividad antibacteriana. El gen sintético E-760S fue insertado en el genoma de  
75 *C. reinhardtii* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Se identificó una línea transgénica en  
76 medio TAP con higromicina y mediante PCR. El incremento de la temperatura del medio  
77 de cultivo de la cepa transgénica a 35°C por 10 min aumentó el nivel de producción de la  
78 proteína recombinante de 0.14 (cultivo no inducido) a 0.36% de proteínas totales solubles  
79 (PTS) esto mediante la cuantificación por ensayo ELISA. E-760 recombinante posee  
80 actividad contra *Staphylococcus aureus* en 0.34 U log, contra *Staphylococcus agalactiae* en  
81 0.48 U log, *Enterococcus faecium* en 0.36 U log, *Pseudomonas aeruginosa* en 2 U log y  
82 para *Klebsiella pneumoniae* la actividad fue de 0.07 U log. Estos resultados demuestran que  
83 la transformación en núcleo de *C. reinhardtii* funciona como una plataforma de expresión  
84 estable para la producción del gen sintético E-760 con potencial para ser utilizado como  
85 antibacteriano.

86

87 Palabras clave: Expresión heteróloga; Actividad antibacteriana; Bacteriocina E-760;  
88 *Chlamydomonas reinhardtii*; Inactivación Log; Transformación nuclear.

89

90

91

92

93

94

95

96 **INTRODUCTION**

97 The problem of bacterial resistance to antibiotics is a priority issue for global health  
98 agencies; such is the case of the World Health Organization (WHO), which in its global  
99 report on surveillance of antimicrobial resistance in 2014, mentioned that society is in a  
100 "post-antibiotic" era and that the crisis of antimicrobial resistance is increasingly serious  
101 (WHO 2014). In response to this global problem, several strategies have been proposed to  
102 combat microbial resistance; one of these strategies is the synthesis and use of  
103 antimicrobial peptides (AMPs), whether natural or synthetic, which can be used as a model  
104 for the design and creation of new functional classes of antibiotics (Tillotson and Theriault  
105 2013). Biologically, AMPs are indispensable components of the innate defense  
106 mechanisms of living beings; they are oligopeptides with a length of 10-50 aminoacid  
107 residues, which have a cationic - amphipathic or hydrophobic helical structure nature that  
108 facilitates the initial interaction with the negatively charged bacterial membrane, damaging  
109 it and causing cell death (Hassan et al., 2012). Furthermore, these peptides show a broad  
110 spectrum of activity against bacteria, fungi, viruses and eukaryotic parasites. AMPs  
111 synthesized by bacteria are called bacteriocins and are ribosomally synthesized peptides of  
112 small size, thermostable, active and highly specific against bacteria closely related to the  
113 producer organism (narrow spectrum) (Cotter et al., 2005). Unlike bacteriocins, eukaryotic  
114 AMPs are usually less specific because they have a broader action spectrum, encompassing  
115 a greater diversity of bacteria (Gram positive and Gram negative) (Hassan et al., 2012). The  
116 bacteria that produce AMPs are immune to their own bacteriocins, due to the synthesis of  
117 specific immunity proteins (Cotter et al., 2005).

118 The lactic acid bacteria (LAB) group is one of the main producers of bacteriocins and also  
119 one of the most studied, due to the fact that most of these bacteria are isolated from food  
120 sources, they are classified into the category GRAS (Generally Recognized As Safe).  
121 Among the most studied bacteriocins are nisin and pediocin PA-1, due to their potential of  
122 being used in the food industry (Woraprayote et al. 2016).

123 Line et al. (2008) isolated and purified a bacteriocin named enterocin E-760 from the genus  
124 *Enterococcus*, using biochemical and chemical methods. This peptide has 62 aminoacid  
125 residues, with a weight of 5,362 kDa. Also, it is thermostable, stable at a pH of 5.0 to 8.7,



126 has a pI of 8.7, and has a broad inhibition spectrum against Gram positive and Gram  
 127 negative bacteria. However, the synthesis and purification of peptides by biochemical and  
 128 chemical methods has high production costs, even higher if the protein is to be massively  
 129 produced. Therefore, several methods have been developed in order to avoid higher costs,  
 130 which are based on the use of molecular techniques for the production of recombinant  
 131 proteins that make possible the mass production of chimeric proteins with important  
 132 pharmacological capacities (Parachin et al., 2012; Arbulu et al., 2015).

133 In the last decades, the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has been used as a platform  
 134 for the production of recombinant proteins because it has a high reproduction rate; its  
 135 growth requirements are minimal, since it is a photosynthetic organism that makes possible  
 136 to obtain crops at commercial scales in a profitable way; it is classified as a GRAS  
 137 organism; and its sequenced genome is available on the PlantGDB platform  
 138 (<http://www.plantgdb.org/CrGDB/>), which facilitates the introduction of interest genes in  
 139 any of its three genomes (nuclear, chloroplast and mitochondrial) by different techniques  
 140 (Barrera and Mayfield, 2013).

141 Although, the transformation methods of *C. reinhardtii* directed to the nucleus or plastids  
 142 are relatively simple, the majority of the high-value recombinant proteins have been  
 143 produced in the chloroplast of the microalgae through direct transformation by  
 144 microprojectile bombardment, a method that requires the use of specialized equipment;  
 145 whereas, the transformation directed to the nucleus mediated by *Agrobacterium*  
 146 *tumefaciens* is a biological method that does not generate damage to the host cell, can  
 147 transfer large fragments (150 kb) to the nuclear genome, integrates a low number of copies  
 148 of the interest gene and does not require specialized equipment, making it a more cost-  
 149 effective and accessible method (Mello-Farias and Chaves, 2008).

150 Therefore, the aim of this study was to design and produce a chimeric protein coding for  
 151 the antibacterial peptide E-760, which was introduced into the nucleus of *C. reinhardtii* by  
 152 *A. tumefaciens*, as well as, the evaluation of its bactericidal activity against some Gram  
 153 positive and Gram negative bacteria.

154

155

156 **MATERIALS AND METHODS**

157 **Culture conditions of algae and bacteria strains.** For the *C. reinhardtii* transformation,  
 158 the cc137 mt (+) strain obtained from the *Chlamydomonas* Resource Center  
 159 (www.chlamycollection.org) was used. The growth of the microalga was in a Tris-Acetate-  
 160 Phosphate (TAP) medium in 2 L flasks at 25 °C with constant stirring (200 rpm), a  
 161 photoperiod of 16:8 h (light: dark) and a light intensity of 5,000 lux. For the transformant  
 162 strains, the same growing conditions were used and hygromycin was added as a selection  
 163 agent (5 mg/L).

164 The *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain was used as the transformation vector  
 165 organism. The bacteria used for the inhibition tests were *Staphylococcus aureus*,  
 166 *Staphylococcus agalactiae* and *Enterococcus faecium* (donated by the Facultad de Ciencias  
 167 Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México),  
 168 *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (provided by the Departamento de  
 169 Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México). All  
 170 bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C under constant stirring (200  
 171 rpm) for 24 h before carrying out any protocol.

172

173 **Design of the synthetic gene coding for the bacteriocin E-760 and plasmid**  
 174 **construction.** A coding chimera for Enterocin E-760 (Line et al., 2008) was designed; the  
 175 synthesis and codon optimization for its expression in the nucleus of *C. reinhardtii* was  
 176 carried out by GenScript Corp (Piscataway, NJ, USA). The chimeric gene was named as E-  
 177 760S and contains 243 bp. Towards the 5' end, it has the *Xba*I restriction site followed by a  
 178 Histidine tag (6 His), a thrombin cutting site and the mature sequence of the bacteriocin E-  
 179 760; whereas towards the 3' end, it has the stop codon (TAA), the ribosome binding site  
 180 (RBS) and the *Nde*I restriction site (Fig. 1).

181 The synthesized E-760S gene was ligated into the pUC vector and was released with the  
 182 *Xba*I and *Nde*I enzymes. On the other hand, the vector pChlamy\_1 (Invitrogen, Waltham,  
 183 MA, USA) was linearized with the same enzymes. Both, the E-760S fragment and the  
 184 pChlamy\_1 vector were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit  
 185 (Promega, Fitchburg, WI). The fragments were ligated with the T4 DNA ligase enzyme  
 186 (Promega, Fitchburg, WI). With this construction (pChlamy1 / E-760S) (Fig. 2), competent

187 cells of *Escherichia coli* TOP10 were thermally transformed and selected in LB medium  
188 supplemented with 100 mg/L ampicillin. Plasmidic DNA was extracted by the Birboin-  
189 Dolly method (Sambrook et al., 1989); a clone with the desired construction was identified  
190 by restriction analysis and subsequent sequencing.

191

192 ***In silico* analysis.** The E-760S sequence was bioinformatically analyzed in order to  
193 characterize the putative protein. The virtual translation was done on the ExPASy platform  
194 (<http://web.expasy.org/translate/>); the determination of the physico-chemical parameters  
195 such as, the isoelectric point (pI) and the Grand Average of Hydropathy (GRAVY) was  
196 performed in the ProtParam platform [<http://web.expasy.org/protparam/>] (Gasteiger et al.,  
197 2005). The aminoacid hydropathy charts were made with the ProtScale tool  
198 [<http://web.expasy.org/protscale/>] (Gasteiger et al., 2005), based on the Kyte and Doolittle  
199 scale. For the search of homologous aminoacid sequences, the Blast program of the Uniprot  
200 database was used (Uniprot, 2017). The conserved motifs were analyzed with the MEME  
201 platform [Motif-based sequence analysis tools; <http://meme.nbcr.net/meme/>] (Bailey et al.,  
202 2009). The multiple alignment of the homologous sequences was performed in the Clustal  
203 Omega program [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>] (Sievers et al., 2011). For the  
204 three-dimensional modeling of the E-760S structure, the PEP-FOLD 3.5 server was used  
205 [<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>] (Lamiabile  
206 et al., 2016); while for the modeling edition, the USCF Chimera version 1.10.1 was used  
207 (Pettersen et al., 2004).

208

209 **Nuclear transformation of *C. reinhardtii*.** With the pChlamy1 / E-760S construction, *A.*  
210 *tumefaciens* GV3101 was transformed by electroporation (BioRad, Hercules, CA, United  
211 States) under the following conditions: 2400 V, 200  $\Omega$ , 25 $\mu$ F. Transformed cells were  
212 inoculated on LB solid medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL) and incubated  
213 at 37 °C for 19 h. For the genetic transformation of *C. reinhardtii* cc137 mt (+) the protocol  
214 described by Kumar et al. (2004) was followed. First, the *A. tumefaciens* transformant was  
215 grown in LB medium with ampicillin (100 mg/L) until reaching an OD of 0.6 and  
216 acetosyringone was added to a final concentration of 100  $\mu$ M. A pre-inoculum of the *C.*  
217 *reinhardtii* strain was grown in liquid TAP medium for 5-7 days, the biomass was

218 concentrated by centrifugation at 2400 rpm and solid TAP medium was inoculated; finally,  
219 the *A. tumefaciens* culture with acetosyringone was added. The co-culture was incubated  
220 for 2 days at 25 °C in total darkness. On the third day, several washes with liquid TAP  
221 medium and cefotaxime (500 mg/L) were performed in order to eliminate *A. tumefaciens*.  
222 Subsequently, the biomass was obtained and plated on solid TAP medium with hygromycin  
223 at 5 mg/L.

224

225 **Selection of recombinant strains by PCR.** The putative transformants of *C. reinhardtii*  
226 were separated after several selection rounds with hygromycin (3 rounds at a concentration  
227 of 5 mg/L, a selection at 10 mg/L and a last round of hygromycin at 20 mg/L). In order to  
228 confirm the presence of the transgene by PCR analysis, genomic DNA extractions were  
229 performed according to the protocol previously described by Newman et al. (1990). We  
230 used specific oligonucleotides for the coding region E760-F: 5'-ggcgcagcaggttggtttt-3' and  
231 E760-R: 5'-cccaaccactaccaggaat-3'. The amplification conditions were: an initial  
232 denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 30s, 62 °C for 30s and  
233 72 °C for 30s; finally, a final extension stage at 72 °C for 3 min. The amplified products  
234 were evaluated in 2% agarose gels, stained with EtBr (0.5 µg/mL) and visualized with UV  
235 light at 260 nm.

236

237 **Induction assay of the recombinant protein E-760S production.** The transgenic strain of  
238 *C. reinhardtii* was inoculated in two flasks of liquid TAP medium at 25 °C under constant  
239 stirring (200 rpm) until logarithmic growth; then, an induction was performed at 35 °C for  
240 10 min and another at 40 °C for 30 min. After induction, the culture was recovered at room  
241 temperature for 2 h and the extraction of Total Soluble Proteins (TSP) was performed.

242

243 **Extraction and quantification of the Total Soluble Protein (TSP).** Liquid cultures of the  
244 transgenic strain of *C. reinhardtii* and the wild type strain (WT) were grown until a late  
245 logarithmic phase; the biomass was concentrated by centrifugation at 10,000 rpm per 5 min  
246 and re suspended in extraction buffer (50mM Tris pH8, 40mM NaCl and 0.1% Tween 20).  
247 Subsequently, cell lysis was performed by sonication (Sonics Vibra-Cell™ Processors  
248 VCX 130 PB) at an 80% amplitude during 20 cycles with 10s of lysis pulses and 5s of rest;

249 the whole process was performed in cold. The lysates were clarified by centrifugation at  
250 13,000 rpm per 10 min. Crude extracts were used to quantify the TSP content of each  
251 culture by the Bradford assay (Bradford, 1976) and subsequently evaluated by 12% SDS-  
252 PAGE (w/v).

253

254 **Purification of the recombinant protein E-760S.** Purification of the recombinant protein  
255 was performed by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), using Ni-NTA  
256 agarose (Invitrogen, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's recommendations.  
257 The transgenic strain of *C. reinhardtii* was grown to a late logarithmic phase in a 1 L flask;  
258 the cell biomass was concentrated as mentioned above and re suspended in loading buffer  
259 (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 adjusted with NaOH). Lysis was performed by  
260 sonication and cell debris was removed by centrifugation at 15,000 g for 20 min at 4 °C.  
261 The final crude extract was added to a Ni<sup>2+</sup>-NTA resin suspension pre-equilibrated with  
262 loading buffer; affinity was carried out for 12 h at 4 °C under gentle stirring. Then, the resin  
263 was packed in a column and 10 washings were performed with loading buffer in order to  
264 remove unwanted proteins; the level of eluted protein was monitored by spectrophotometry  
265 at 280 nm. The elution of the recombinant protein was carried out by washing 10 times the  
266 resin with elution buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM Imidazole, pH 8.0),  
267 monitoring the eluted protein by spectrophotometry.

268

269 **Quantification of the chimeric protein E-760S by ELISA assay.** For quantification by  
270 ELISA assay, a microtiter plate was coated with TSP (90 µg/well) of both the transgenic  
271 and the wild type strains and incubated 12 h at 4 °C, together with a standard curve made of  
272 known amounts of the E-760 protein purified from *C. reinhardtii*. The wells were washed  
273 with Phosphate Buffered Saline + Tween (PBST, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM  
274 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3mM KCl, 0.05% Tween® 20, pH 7.4) and blocked for 1 h at room temperature  
275 with 5% milk dissolved in PBS. The plate was washed with PBST and incubated for 1 h at  
276 37 °C with a primary antibody directed to the His tag. After washing with PBST, the plates  
277 were incubated 1 hour at room temperature with a secondary antibody conjugated with  
278 horseradish peroxidase (HRP). The activity reaction of the peroxidase was developed with  
279 ABTS Substrate (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA). The content of E-760S



280 was quantified by measuring the optical density at a wavelength of 450 nm in a microplate  
281 reader (GloMax®-Multi+ Detection System. Promega). The amount of the E-760 protein  
282 was expressed as % of TSP. The statistical significance of the differences ( $P < 0.05$ )  
283 between the uninduced, induced (transgenic strain) and wild type of *C. reinhardtii* was  
284 determined by a one-way analysis of variance.

285

286 **Evaluation of the antibacterial activity of E-760S.** The antibacterial activity of E-760S  
287 was analyzed against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*  
288 *aureus*, *Staphylococcus agalactiae* and *Enterococcus faecium*, all belonging to clinical  
289 isolates. From the axenic cultures of each strain, a colony was taken and inoculated in 5 mL  
290 of liquid LB medium for 24 h at 37 °C under constant stirring (200 rpm). A volume of 1.5  
291 mL of the culture was centrifuged at 12,000 rpm per 5 min, the supernatant was removed  
292 and the pellet was resuspended in 1 mL of sterile potassium phosphate buffer (0.05 M pH  
293 7). The microbial suspension was adjusted to obtain a titre of  $10^6$  CFU/mL (Colony  
294 Forming Units per milliliter). Once the bacterial load was obtained, the necessary amount  
295 of TSP was added until reaching 560 and 1,120  $\mu\text{g/mL}$  concentrations and it was brought to  
296 a final volume of 1 mL by adding phosphate buffer. As controls, bacterial suspensions  
297 eluted in TSP of unprocessed *C. reinhardtii* were used in phosphate buffer and ampicillin  
298 (0.3 mg/mL) under the same growing conditions. The inhibition of microorganisms was  
299 evaluated at 0, 30, 60, 120, 240 and 480 minutes. After each exposure period, aliquots were  
300 taken from the suspension and inoculated in solid LB medium for 19 h at 37 °C and the  
301 CFU/mL number was counted. The log inactivation was calculated as  $\log_{10} (N/N_0)$ , where  
302  $N_0$  represents the initial CFU/mL and  $N$  the CFU/mL treatment survivors (Garcidueñas-  
303 Piña et al., 2016). The experiments were performed for triplicate and maintained under  
304 sterile conditions.

305

## 306 **RESULTS**

### 307 ***In silico* analysis of the synthetic gene E-760S**

308 The virtual translation of the E-760S chimera shows that each element that conform the  
309 synthetic gene is in the correct Open Reading Frame, since the protein synthesis begins  
310 with the aminoacid Methionine (M) followed by the Histidine tag (6 His), a cutting site for



311 Thrombin and the sequence of the bacteriocin E-760 (Fig. 1). The analysis of physical and  
312 chemical parameters showed that the peptide is composed by 40.8% of hydrophilic residues  
313 (GSTCYNQ), 36.7% of hydrophobic residues (AVLIPMFW), 18.4% of basic residues  
314 (KRH) and 3.9% of acid residues (DE). Additionally, it has a hypothetical weight of 7.8  
315 kDa, an isoelectric point (pI) of 9.3, a net charge of 4.5 at pH 7 and a -0.308 GRAVY,  
316 which indicates that the protein is slightly hydrophilic (Fig. 3).

317 In the search for homologous genes of the E-760S chimera, high similarity was found with  
318 the sequence of the bacteriocin Amylovorin-L471 (P80696) produced by *Lactobacillus*  
319 *amylovorus* and with an uncharacterized protein (UP) (A0A0R1GLB9) produced by  
320 *Lactobacillus crispatus* with antibacterial activity.

321 The alignment of E-760, Amylovorin-L471 and UP showed the presence of two conserved  
322 motifs, the NRW motif which in the three sequences is located towards the *N*-terminal end  
323 and the GGVGGAAVCGLAGYV motif, which is towards the *N*-terminal end of E-760; for  
324 Amylovorin-L471 and the UP, it was identified towards the *C*-terminal end. E-760 lacks  
325 the intermediate aminoacids between both motifs unlike the other analyzed sequences (Fig.  
326 4). The putative three-dimensional model of E-760 is illustrated in Figure 5.

327

### 328 **Selection of *C. reinhardtii* nucleus transformants and PCR analysis**

329 Transformation by *A. tumefaciens* was successful in obtaining 20 presumptive  
330 transformants; however, due to contamination problems, only one clone was used for  
331 further analysis. DNA was extracted from the presumed transformant clone in order to  
332 detect the transgene presence by PCR. The size fragment of both, transformant and positive  
333 control, was 139 bp, while for the negative control (*C. reinhardtii* untransformed) there was  
334 no amplification (Fig. 6). The amplification of this fragment indicated the presence of the  
335 transgene in the clone and was confirmed by its growth after five rounds in the selection  
336 medium.

337

### 338 **Quantification of the expressed protein by ELISA**

339 The expression level of the E-760S gene in the *C. reinhardtii* transformant was quantified  
340 by ELISA assay and compared with the untransformed strain using as standard the purified

341 E-760 protein from *C. reinhardtii*. The amount of protein E-760 was expressed as TSP  
342 percentage, which was 0.36% for the *C. reinhardtii* induced culture (IC) at 35 °C; while for  
343 the non-induced culture (NIC), the percentage was 0.14% (Fig. 7). It should be mentioned  
344 that the E-760 value for *C. reinhardtii* induced at 40 °C was practically null (results not  
345 shown), which could be due to cell death; so, this treatment was not evaluated in the  
346 antibacterial activity tests.

347

#### 348 **Evaluation of the antibacterial activity of TSP extracts of transgenic and wild type *C.*** 349 ***reinhardtii***

350 The TSP extracts from the E-760 transformed strain induced at 35 °C showed greater  
351 inactivation than the TSP extracts of not induced E-760 against *Staphylococcus aureus*,  
352 *Staphylococcus agalactiae* and *Enterococcus faecium*; whereas for *Klebsiella pneumoniae*,  
353 the inactivation results between both extracts were very similar. For *Pseudomonas*  
354 *aeruginosa*, the non-induced E-760 extract showed the greatest inhibitory effect.

355 Specifically for *S. aureus*, the TSP extract of the induced E-760S in both concentrations  
356 registered a gradual increase in the inhibition of bacterial growth in each evaluated  
357 exposure time, in addition to having a higher bactericidal effect than the one obtained for  
358 ampicillin. The maximum inactivation value for the 560 µg concentration was 0.29 U log at  
359 120 min of exposure, while for the 1,120 µg concentration was 0.34 U log at the maximum  
360 evaluated time. The greatest bactericidal effect of the ampicillin treatment was achieved at  
361 480 min with an inactivation of 0.16 U log. For both TSP extracts of the non-induced E-  
362 760S, minimal inhibition values were obtained, almost comparable with the extracts of the  
363 wild type strain (Fig. 8a).

364 For *S. agalactiae*, ampicillin exerted a strong inhibitory effect at 0.3 mg/mL, achieving the  
365 total inactivation of the cells at 120 min of exposure. On the other hand, the TSP extract of  
366 induced E-760S at 1,120 µg was the one that showed the best antibacterial activity (0.5 U  
367 log) at 60 minutes of exposure; however, bacterial growth increased after 120 min (Fig.  
368 8b).

369 For *E. faecium*, the TSP extract of E-760S at 560 µg recorded the highest inhibition (0.36 U  
370 log) at 120 minutes of exposure; however, the growth kinetics increased after 240 min.

371 After 30 min of exposure, all the analyzed treatments showed a slight inactivation;  
372 however, after 60 min, the growth kinetics of bacteria increased considerably (Fig. 8c).  
373 For *P. aeruginosa*, the TSP extracts of non-induced E-760 in both concentrations were  
374 more efficient. The maximum inactivation value was recorded at the longest exposure time,  
375 being 560 µg of TSP, the concentration with the highest inhibition (1.9 U log); while for the  
376 of 1,120 µg concentration, it was 1.6 U log. The TSP of WT also showed inactivation (0.9  
377 U log) against *P. aeruginosa*, registered at the maximum exposure time. It should be noted  
378 that the aforementioned TSP extracts were more efficient in bacterial inhibition than  
379 ampicillin (0.3 mg/mL), since their maximum inactivation value was 1 U log at 480 min  
380 (Fig. 8e).

381  
382

### 383 **DISCUSSION**

384 In this study, the expression ability of the antibacterial peptide E-760 by recombinant route  
385 in the nucleus of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* was analyzed, in order to be  
386 used as a stable platform for the mass production of peptides of pharmacological interest.  
387 *C. reinhardtii* has been reported as a robust platform for the production of recombinant  
388 proteins specifically in chloroplasts (Rasala et al., 2010; Campos-Quevedo et al., 2013).  
389 However, there are few reports regarding the production of recombinant proteins in the  
390 microalga nucleus through the transformation performed by *Agrobacterium tumefaciens*.  
391 Antibacterial peptides are a promising alternative for the inhibition of antibiotic resistant  
392 pathogens. In order to achieve a better characterization of the interest peptide (e.g. to  
393 determine action mechanisms, structure and function, or its potential use as a medicine) it is  
394 necessary to obtain a reasonable amount of this peptide; however, there are some issues that  
395 prevent it from being obtained in a massive way, such as the low yield of the interest  
396 peptide when it is purified directly from the natural host, the production of potential  
397 virulence factors of some bacterial producers and the high production costs by chemical  
398 synthesis (Parachin et al., 2012; Arbulu et al., 2015). Due to the aforementioned, the  
399 production of antimicrobial peptides by recombinant pathways using heterologous  
400 expression systems such as bacteria (Mesa-Pereira et al., 2017), yeast (Arbulu et al., 2015),

401 microalgae (Mu et al., 2012) and plants (Zakharchenko et al., 2013) has become a rapidly  
402 expanding research area.

403 AMPs are generally cationic, with charges ranging from +2 to +9. This positive charge is  
404 important for the initial attraction and interaction with the anionic cell membranes of  
405 bacteria and other pathogenic microorganisms; so, relatively less anionic membranes will  
406 not attract electrostatically the AMPs (Ebenhan et al., 2014). According to its physico-  
407 chemical characteristics, the bacteriocin E-760 can be defined as a cationic peptide  
408 according to the *in silico* results, since it contains 40.8% of hydrophilic aminoacids and  
409 36.7% of hydrophobic residues, coinciding with Line et al. (2008), but it differs in the  
410 isoelectric point (i.e. they report it as 8.7, whereas we reported as 9.3). In most AMPs, the  
411 hydrophobicity is around 50% and is essential for the functioning of the peptide, since it  
412 allows the peptide to interact and penetrate the phospholipid bilayer (Ebenhan et al., 2014);  
413 in our case, the peptide E-760 was slightly hydrophobic according to the scale of Kyte and  
414 Doolittle (Fig. 3). The influence of the hydrophobicity degree in an AMP on the  
415 antibacterial specificity can be modified by using analogs of variable hydrophobicity. For  
416 example, by increasing the hydrophobicity in an analogue of the Magainin 2 Amide (M2a)  
417 peptide, the activity against *E. coli* was increased; on the contrary, the selectivity against *P.*  
418 *aeruginosa* decreased (Wieprecht et al., 1997), which demonstrates the low correlation  
419 between the hydrophobicity of the peptides and their ability to permeabilize biomembranes.

420 Antibacterial peptides synthesized by lactic acid bacteria (LAB) are divided into two  
421 classes. Class I consists of bacteriocins named lantibiotics, which contain one or more  
422 residues of modified aminoacids, while Class II consists of small (<10kDa) and  
423 thermostable bacteriocins that lack modified residues (Nissen-Meyer et al., 2010; Cotter et  
424 al., 2013). Class II bacteriocins are divided into four subclasses. Class IIa contains  
425 pediocin-type bacteriocins that have similar aminoacid sequences; Class IIb contains  
426 bacteriocins of two peptides; Class IIc consists of cyclic bacteriocins, whose *N*- and *C*-  
427 ends are covalently bound; and Class IId, contains non-cyclic bacteriocins that do not show  
428 any similarity in the sequence of pediocin-type bacteriocins (Nissen-Meyer et al., 2010;  
429 Cotter et al., 2013). Peptide E-760 is classified within Class II bacteriocins, since it is a  
430 thermostable, small peptide (5.3 kDa) which does not contain modified residues (Line et  
431 al., 2008). However, there is some discrepancy regarding its classification, because it does

432 not fully comply with the distinctive characteristics of Class IIa or Class IIb bacteriocins.  
433 Some authors classify E-760 within Class IIa (Belguesmia et al., 2011), which is  
434 characterized by the presence of an YGNGVxC motif (where V can be replaced by L in  
435 some cases) in the *N*-terminal region of the peptide (Cotter et al., 2013); but E-760 lacks  
436 this motif (Fig. 4). On the other hand, Uniprot (UniProt, 2017) and BACTIBASE (available  
437 in <http://bactibase.hammamilab.org/BAC174>) (Hammami et al., 2007) platforms, indicates  
438 that E-760 belongs to the Class IIb, including the Amylovorin peptide. An interesting  
439 structural feature of all Class IIb bacteriocins is the presence of GxxxG motifs (where x  
440 represents any residue) and GxxxG type motifs [conformed by A (AxxxA) or S (SxxxS)]  
441 that facilitate helix-helix interactions and promote the oligomerization of transmembrane  
442 helical peptides or membrane protein domains (Nissen-Meyer et al., 2010; Kyriakou et al.,  
443 2016). Based on the aforementioned, the E-760 sequence presents two GxxxG motifs  
444 (GGVGG and GMAGG) and one SxxxS motif (SFPGS) (Fig. 4). Although E-760 shares  
445 this Class IIb uniqueness, it lacks the second characteristic peptide of this category; since in  
446 order to achieve an optimal antibacterial activity, the presence of both peptides is required  
447 in approximately equal amounts (Nissen-Meyer et al., 2010).

448 In the absence of structural models of the peptide E-760, 13 hypothetical models were  
449 obtained, which had  $\alpha$ -helix structures. Figure 5 shows the model obtained from PEP-  
450 FOLD 3.5 (Lamiable et al., 2016). It is important to mention that there are few studies  
451 related to bacteriocin E-760 (Line et al., 2008; Arbulu et al., 2015); so this peptide has not  
452 been fully characterized yet at the biochemical and molecular levels.

453 Due to the fact that transgenes with a strong deviation of codons or with low GC content  
454 are poorly expressed in *C. reinhardtii* (Barahimipour et al., 2016) because the nuclear  
455 genome of this microalga presents a high content of GC (64%) (Merchant et al., 2007), a  
456 codon optimization was carried out for an efficient expression of the E-760S transgene in  
457 the nucleus of *C. reinhardtii*. PCR analysis with specific primers demonstrated the  
458 integration of the E-760S gene into the nuclear genome of the microalga (Fig. 6). Derived  
459 from the event of nuclear transformation mediated by *A. tumefaciens*, 20 possible  
460 transformed clones were obtained; however, only one clone was analyzed due to  
461 contamination problems. There are few studies of stable genetic transformation of the  
462 nuclear genome of *C. reinhardtii* mediated by *A. tumefaciens*; however, it is reported that



463 the transformation frequency of this method is 50 times higher than the transformation with  
464 glass beads (Kumar et al., 2004). Different methods for the nuclear transformation of  
465 microalgae have been developed, including biobalistics (Koop et al., 2007), electroporation  
466 (Kang et al., 2015), stirring with glass beads (Neupert et al., 2009) or with silicon carbide  
467 fibers (Dunahay, 1993); so, the research related to the effective use of nuclear  
468 transformation mediated by *A. tumefaciens* in microalgae is still minimal (Kumar et al.,  
469 2004; Pratheesh et al., 2014).

470 The transgenic line generated with the construction of pChlamy1 / E-760S showed that the  
471 nucleus of *C. reinhardtii* is a stable system for the expression of heterologous proteins.  
472 According to the ELISA quantification and the use of the anti-His antibody, it was  
473 determined that the evaluated transgenic line produced a recombinant protein between 0.14  
474 (Non-Induced Culture) and 0.36% (Induced Culture) in TSP extracts (Fig. 7). Transgene  
475 expression yields have been reported in the nucleus of microalgae and plants, which are  
476 very similar or lower than the ones obtained in this investigation. For example, the reporter  
477 gene encoding for the green fluorescent protein GFP expressed in mutant strains of *C.*  
478 *reinhardtii* had a 0.2% yield, which is considered a relatively high value for nuclear  
479 expression in algae (Neupert et al., 2009); the P24 antigen of HIV obtained by recombinant  
480 route in *C. reinhardtii*, had an accumulation up to 0.25% of total cellular protein  
481 (Barahimipour et al., 2016). This comparison can be made also with plants such as tobacco,  
482 where the HIV P24 antigen reached an accumulation of 3.5 mg/g of soluble protein in leaf  
483 (Zhang et al., 2002); potato tubers, where human proinsulin was expressed with a 0.1%  
484 TSP yield (Arakawa et al., 1998) and in *Arabidopsis* (0.1% of total protein in seed)  
485 (Nykiforuk et al., 2006). These data and the fact that our transgenic clone accumulated the  
486 chimeric protein at levels above 0.1% of TSP, confirm that the microalga nucleus is  
487 capable of producing heterologous proteins under the chimeric promoter HSP70A /  
488 RBCS2.

489 The induction process by thermal shock at 35 °C per 10 min carried out in this study was  
490 effective in the expression of E-760S in 2.5 more times than the non-induced culture (Fig.  
491 7). This increased expression phenomenon of recombinant proteins by induction with  
492 thermal shock in *C. reinhardtii* under the chimeric promoter HSP70A / RBCS2, has already  
493 been reported in the expression of the antibacterial peptide Cecropin B, where the induction



494 condition was a thermal shock at 40 °C for 30 min; although, the expression increase of the  
495 recombinant protein is not mentioned (Mu et al., 2012). In this investigation, the induction  
496 was analyzed at 35 °C and 40 °C at 10 and 30 min, respectively; however, the cell culture  
497 changed from an intense green color to a yellowish green one at a longer induction time.  
498 Although, the sample was processed and when it was quantified by ELISA, the values of  
499 the recombinant protein were practically null (results not shown), which could be due to  
500 cell death. *C. reinhardtii* is a mesophilic microalga, whose optimum growth temperature is  
501 between 20-32 °C; therefore, an abrupt transfer at a temperature above the ideal growth  
502 range triggers adaptive responses that may or may not allow the resumption of growth or  
503 survival to the new temperature. A prolonged exposure to incompatible temperatures  
504 results in a cessation of metabolism, chlorosis and finally cell death (Xie et al., 2013).  
505 Regarding the functional analysis of the recombinant bacteriocin E-760 against the  
506 analyzed bacteria, a moderate inhibitory effect was shown that was greater than the one  
507 produced by the TSP of the WT strain. Only in *S. agalactiae*, the control treatment of  
508 ampicillin (0.3 mg/mL) was efficient, since it exerted a strong bactericidal activity to  
509 achieve a complete inhibition at 120 minutes of exposure; so it could be hypothesized that  
510 the analyzed strains have certain level of resistance to the antibiotic. Other studies have  
511 reported, the production and purification of E-760 by chemical methods and has been  
512 characterized as an effective bacteriocin with a broad activity spectrum against Gram-  
513 positive (*S. aureus*, *S. epidermidis* and *L. monocytogenes*) and Gram-negative (sero-  
514 varieties of *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*,  
515 *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* and *Campylobacter jejuni*) bacteria at  
516 concentrations ranging from 0.1 to 3.2 µg/mL (Line et al., 2008); concentrations lower than  
517 the ones used in our research (0.8 - 3.8 µg/mL). However, it has been reported in  
518 chemically synthesized AMPs of animal origin, the use of concentrations higher than those  
519 analyzed in this research ranging from 4 to > 128 mg/L against multi-drug resistant bacteria,  
520 such as *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and Methicilin Resistant *S. aureus*  
521 (MRSA) (Liu et al., 2015). The interest for producing the synthetic bacteriocin E-760 by  
522 recombinant routes is latent, since it was tried to be produced previously in the *Pichia*  
523 *pastoris* yeast; however, the expression of the heterologous protein failed because the  
524 sequencing analysis determined that none of the obtained peptide fragments coincided with

525 the expected aminoacid sequence, suggesting the existence of truncated bacteriocins,  
526 interaction of bacteriocins with unknown biological compounds or post-translational  
527 modification processes (Arbulu et al., 2015).

528 In this study we demonstrate the stable expression of a heterologous gene coding for the  
529 antibacterial peptide E-760 in the nucleus of the transformed microalgae *C. reinhardtii* via  
530 *A. tumefaciens*, as well as its antibacterial activity, which highlights the feasibility of using  
531 the nuclear genome of microalgae as a potential producer of pharmacologically important  
532 proteins.

533

### 534 **ACKNOWLEDGMENTS**

535 The authors want to thank CONACYT for the doctoral scholarship number 401222. This  
536 project was supported by the Autonomous University of San Luis Potosí who financed the  
537 purchase of the synthetic gene and reagents for the nuclear transformation and the initial  
538 characterization and by the Autonomous University of Aguascalientes with grant number  
539 PIBT16-1.

540

### 541 **REFERENCES**

542 Arakawa, T., J. Yu, D.K.X. Chong, J. Hough, P.C. Engen & W.H.R. Langridge (1998). A plant-based cholera toxin B  
543 subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology* 16:934-  
544 938.

545 Arbulu, S., J.J. Jiménez, L. Gutiez, L.M. Cintas, C. Herranz & P.E. Hernández (2015). Cloning and expression of  
546 synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by  
547 recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Research International* 2015:11.

548 Bailey, T.L., J.G. Johnson, E. Charles & W.S. Noble (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research* 43: W39-W49.

549 Barahimipour, R., J. Neupert & R. Bock (2016). Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga  
550 *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Molecular Biology*  
551 90:403-418.

552 Barrera, D.J. & S.P. Mayfield (2013). High-value recombinant protein production in microalgae. In: Richmond, A. and  
553 Hu, Q. (eds), pp 532-544. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2nd edn., Oxford, UK.  
554 736 p.

- 555 Belguesmia, Y., K. Naghmouchi, N. Chihib & D. Drider (2011). Class IIa bacteriocins: current knowledge and  
 556 perspectives. In: Drider, D. and Rebuffat, S. (eds), pp 171-195. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to  
 557 applications. Springer-Verlag New York, USA. 451 p.
- 558 Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the  
 559 principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- 560 Campos-Quevedo N., S. Rosales-Mendoza, L.M.T. Paz-Maldonado, L. Martínez-Salgado, J.C. Guevara-Arauz & R.E.  
 561 Soria-Guerra (2013). Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of  
 562 *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113:217-225.
- 563 Cotter, P.D., C. Hill & R.P. Ross (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews*  
 564 *Microbiology* 3:777-788.
- 565 Cotter, P.D., R.P. Ross & C. Hill (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*  
 566 11:95-105.
- 567 Dunahay, T.G. (1993). Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*  
 568 15:452-460.
- 569 Ebenhan, T., O. Gheysens, H.G. Kruger, J.R. Zeevaart & M.M. Sathekge (2014). Antimicrobial peptides: their role as  
 570 infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed Research International* 2014:15.
- 571 Garcidueñas-Piña, C., I.E. Medina-Ramírez, P. Guzmán, R. Rico-Martínez, J.F. Morales-Domínguez & I. Rubio-  
 572 Franchini (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of nanostructured materials of titanium dioxide doped with  
 573 silver and/or copper and their effects on *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Photoenergy*.  
 574 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8060847>
- 575 Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel & A. Bairoch (2005). Protein  
 576 identification and analysis tools on the ExpASY Server. In: Walker, J.M. (ed), pp 571-607. The Proteomics Protocols  
 577 Handbook. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- 578 Hammami, R., A. Zouhir, J. Ben Hamida & I. Fliss (2007). BACTIBASE: a web-accessible database for bacteriocin  
 579 characterization. *BMC Microbiology* 7:89.
- 580 Hassan, M., M. Kjos, I.F. Nes, D.B. Diep, et al. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and  
 581 potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113:723-736.
- 582 Kang, S., K.H. Kim & Y.C. Kim (2015). A novel electroporation system for efficient molecular delivery into  
 583 *Chlamydomonas reinhardtii* with a 3-dimensional microelectrode. *Scientific Reports* <http://doi.org/10.1038/srep15835>.
- 584 Koop, H.U., S. Herz, T.J. Golds & J. Nickelsen (2007). The genetic transformation of plastids. In: Bock, R. (ed), pp 457-  
 585 510. Cell and molecular biology of plastids. Topics in Current Genetics, vol 19. Springer, Berlin.

- 586 Kumar, S.V., R.W. Misquitta, V.S. Reddy, B.J. Rao & W.V. Rajam (2004). Genetic transformation of the green alga—  
587 *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 166:731-738.
- 588 Kyriakou, P.K., B. Ekblad, P.E. Kristiansen & Y.N. Kaznessis (2016). Interactions of a class IIb bacteriocin with a model  
589 lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*  
590 *Biomembranes* 4:824-835.
- 591 Lamiable, A., P. Thévenet, J. Rey, M. Vavrusa, P. Derreumaux & P. Tufféry (2016). PEP-FOLD3: faster de novo  
592 structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research* 44:W449-54.
- 593 Line, J.E., E.A. Svetoch, B.V. Eruslanov, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.P. Levchuk, O.E. Svetoch,  
594 B.S. Seal, G.R. Siragusa & N.J. Stern (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial  
595 activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:1094-1100.
- 596 Liu, C.B., B. Shan, H.M. Bai, J. Tang, L.Z. Yan & Y.B. Ma (2015). Hydrophilic/hydrophobic characters of antimicrobial  
597 peptides derived from animals and their effects on multidrug resistant clinical isolates. *Zoological Research* 36:41-47.
- 598 Mello-Farias, P.C. & A.L.S. Chaves (2008). Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on  
599 soybean. *Scientia Agricola* 65:95-106.
- 600 Merchant, S.S., S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S.J. Karpowicz, G.B. Witman, et al. (2007). The *Chlamydomonas*  
601 genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.
- 602 Mesa-Pereira, B., P.M. O'Connor, M.C. Rea, P.D. Cotter, C. Hill & R.P. Ross (2017). Controlled functional expression of  
603 the bacteriocins pediocin PA-1 and bactoformicin A in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* <http://doi.org/10.1038/s41598-017-02868-w>  
604
- 605 Mu, F.Y., H. Li & Z.L. Hu (2012). Expression of tandem repeat Cecropin B in *Chlamydomonas reinhardtii* and its  
606 antibacterial effect. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 39:344-351.
- 607 Neupert, J., D. Karcher & R. Bock (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear  
608 transgenes. *The Plant Journal* 57:1140-1150.
- 609 Newman, S., J.E. Boynton, N.W. Gillham, B.L. Randolph-Anderson, A.M. Johnson & E.H. Harris (1990). Transformation  
610 of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: Molecular and genetic characterization of integration events.  
611 *Genetics* 126:875-888.
- 612 Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H.S. Haugen & P.E. Kristiansen (2010). Structure and mode-of-action of the  
613 two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2:52-60.
- 614 Nykiforuk, C.L., J.G. Boothe, E.W. Murray, R.G. Keon, H.J. Goren, N.A. Markley & M.M. Moloney (2006). Transgenic  
615 expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant*  
616 *Biotechnology Journal* 4:77-85.

- 617 Parachin, N.S., K.C. Mulder, A.A.B. Viana, S.C. Dias & O.L. Franco (2012). Expression systems for heterologous  
618 production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38:446-456.
- 619 Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng & T.E. Ferrin (2004). UCSF  
620 Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25:1605-12.
- 621 Pratheesh, P.T., M. Vineetha & G.M. Kurup (2014). An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic  
622 transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology* 56:507-515.
- 623 Rasala, B.A., M. Muto, P.A. Lee, M. Jager, R.M.F. Cardoso, C.A. Behnke, P. Kirk, C.A. Hokanson, R. Crea, M. Mendez  
624 & S.P. Mayfield (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the  
625 chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal* 8:719-733.
- 626 Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor  
627 Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- 628 Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D.  
629 Thompson & D.G. Higgins (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using  
630 Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539.
- 631 Tillotson, G.S. & N. Theriault (2013). New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. *F1000Prime*  
632 *Reports*. <http://doi.org/10.12703/P5-51>
- 633 UniProt: the universal protein knowledgebase (2017). *Nucleic Acids Research* 45:D158-D169.
- 634 Wieprecht, T., M. Dathe, M. Beyermann, E. Krause, W.L. Maloy, D.L. MacDonald & M. Bienert (1997). Peptide  
635 hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*  
636 36:6124-6132.
- 637 Woraprayote, W., Y. Malila, S. Sorapukdee, A. Swetwathana, S. Benjakul & W. Visessanguan (2016). Bacteriocins  
638 from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* 120:118-132.
- 639 WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance [WWW Document], URL  
640 <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>. Accessed 23 August 2017
- 641 Xie, B., S. Bishop, D. Stessman, D. Wright, M.H. Spalding & L.J. Halverson (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* thermal  
642 tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B(12)-producing bacteria. *ISME Journal*  
643 7:1544-1555.
- 644 Zakharchenko, N.S., I. Buryanov Ya, A.A. Lebedeva, S.V. Pigoleva, D.V. Vetoshkina, E.V. Loktyushov, V.D.  
645 Chepurnova, A.A. Kreslavski, A.A. Kosobryukhov (2013). Physiological features of rapeseed plants expressing the gene  
646 for an antimicrobial peptide cecropin P1. *Russian Journal of Plant Physiology* 60:411-419.
- 647 Zhang, G.G., L. Rodrigues, B. Rovinski & K.A. White (2002). Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco  
648 plants. *Molecular Biotechnology* 20:131-136.

649

650 **Figure legends**

651 **Fig. 1.** Nucleotide and putative aminoacid sequence of E-760S. The sequence E-760S was subjected to codon  
 652 optimization for its expression in the *C. reinhardtii* nucleus. The chimeric gene is flanked by the *XbaI* and  
 653 *NdeI* restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively. The start codon (M), the mature sequence of E-760  
 654 and the stop codon (-) are highlighted in bold letters; the Histidine tag (6 His) is underlined; the ribosome  
 655 binding site (RBS) is shown as a discontinuous underline.

656

657 **Fig. 1.** Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de E-760S. La secuencia E-760S se sometió a  
 658 optimización de codones para su expresión en núcleo en *C. reinhardtii*. El gen quimérico esta flanqueado por  
 659 los sitios de restricción *XbaI* y *NdeI* a los extremos 5' y 3' respectivamente. Resaltados en negritas se señala  
 660 el codón de inicio (M), la secuencia madura de E-760 y el codón de paro (-), subrayado se señala la etiqueta  
 661 de histidinas (6 His), subrayado discontinuo se señala el sitio de unión a ribosomas (RBS).

662

663

664 **Fig. 2.** Construction of pChlamy1 / E-760S. a) E-760S scheme. b) The expression vector pChlamy\_1 has the  
 665 following elements: Hsp70A-Rbc S2 is a constitutive chimeric/hybrid promoter formed by the heat shock  
 666 protein 70A and the RuBisCO small subunit; Int-1 Rbc S2 is the first intron of the RuBisCO small subunit  
 667 (*rbcS2*) necessary to maintain the high expression of the interest gene;  $\beta$ 2-Tubulin, strong native promoter of  
 668 *C. reinhardtii* that drives the expression of the *Aph7* gene. *Aph7* is the aminoglycoside phosphotransferase  
 669 gene from *Streptomyces hygrosopicus*, which confers hygromycin resistance.

670

671 **Fig. 2.** Construcción pChlamy1 / E-760S. a) Esquema de E-760S. b) El vector de expresión pChlamy\_1  
 672 cuenta con los siguientes elementos. Hsp70A-Rbc S2 es un promotor quimérico/híbrido constitutivo  
 673 conformado por la proteína del choque térmico 70A y la subunidad pequeña de la RuBisCO, Int-1 Rbc S2 es  
 674 el primer intrón de la subunidad pequeña de la RuBisCO (*rbcS2*) necesaria para mantener la alta expresión del  
 675 gen de interés,  $\beta$ 2-Tubulin, fuerte promotor nativo de *C. reinhardtii* que conduce la expresión del gen *Aph7*.  
 676 *Aph7*, gen de la aminoglucósido fosfotransferasa de *Streptomyces hygrosopicus* que confiere resistencia a  
 677 higromicina.

678

679

680 **Fig. 3.** Aminoacid hydrophaticity of E-760S. Plotted data were obtained based on the scale of Kyte and  
 681 Doolittle, where: the lower the value, the more hydrophilic the aminoacid is.

682

683 **Fig. 3.** Hidropaticidad de aminoácidos de E-760S. Los datos graficados se obtuvieron en base a la escala de  
 684 Kyte y Doolittle, donde entre menor es el valor más hidrofílico es el aminoácido.



685

686

687 **Fig. 4.** Alignment of E-760, Am and UP. The conserved motifs are framed in black boxes. The GxxxG and  
 688 SxxxS motifs present in E-760 are shaded in black. Dotted line boxes show the missing sequence in E-760. E-  
 689 760= Enterocin E-760 (*Enterococcus sp.*); amyL= Amylovorin-L471 (*Lactobacillus amylovorus*); UP=  
 690 Uncharacterized protein (*Lactobacillus crispatus*).

691

692 **Fig. 4.** Alineamiento de E-760, Am y UP. Enmarcados en recuadros negros se encuentran los motivos  
 693 conservados. Sombreados en negro se enmarcan los motivos GxxxG y SxxxS presentes en E-760.  
 694 Enmarcados en recuadros de línea punteada se encuentra la secuencia faltante en E-760. E-760= Enterocina  
 695 E-760 (*Enterococcus sp.*); amyL= Amylovorin-L471 (*Lactobacillus amylovorus*); UP= Uncharacterized  
 696 protein (*Lactobacillus crispatus*).

697

698

699 **Fig. 5.** Hypothetical structure of the bacteriocin E-760. According to the three-dimensional model elaborated  
 700 by the PEP-FOLD 3.5 server, it contains 3  $\alpha$ -helix.

701

702 **Fig. 5.** Estructura hipotética de la bacteriocina E-760. Según el modelo tridimensional arrojado por el servidor  
 703 PEP-FOLD 3.5 esta contiene 3  $\alpha$ -hélice.

704

705

706 **Fig. 6.** PCR analysis of *C. reinhardtii* transformants using specific primers for the E-760S gene. M: 100 bp  
 707 molecular weight marker; B: Negative control of the reaction (Without DNA); WT: wild type strain of *C.*  
 708 *reinhardtii*; C+: Positive control, pUC18 / E-760S; M: Transformant of *C. reinhardtii* with the pChlamy1 / E-  
 709 760S construction.

710

711 **Fig. 6.** Análisis de PCR de transformantes de *C. reinhardtii* utilizando oligonucleótidos específicos para el  
 712 gen E-760S. M: marcador de peso molecular de 100 pb; B: Control negativo de la reacción (Sin ADN); WT:  
 713 cepa silvestre de *C. reinhardtii*; C+: Control positivo, pUC18 / E-760S; M: Transformante de *C. reinhardtii*  
 714 con la construcción pChlamy1 / E-760S.

715

716

717 **Fig. 7** Accumulation levels of the recombinant protein E-760 in the evaluated transgenic line. Quantification  
 718 of the recombinant protein by ELISA assay was determined at a known concentration of transformed TSP of  
 719 *C. reinhardtii* (90  $\mu$ g/ well) and standardized against a linear curve of a known quantity of the purified E-760  
 720 protein standard of *C. reinhardtii*. The amount of protein was expressed as TSP percentage. The TSP  
 721 absorbance of the wild type strain (WT) used as control was almost equal to the one of the bottom of the plate

722 wells. The assay was performed with an antibody directed to the Histidine tag. Values are the averages of two  
 723 replicates with standard deviations. (WT) Untransformed *C. reinhardtii*; (E-760) Transformed *C. reinhardtii*  
 724 with non-induced E-760; (E-760SInd.) Transformed *C. reinhardtii* with E-760S Induced at 35 °C/10 min.  
 725 Different letters indicate statistically significant differences between treatments (P < 0.05).

726

727 **Fig. 7.** Niveles de acumulación de la proteína recombinante E-760 en la línea transgénica evaluada. La  
 728 cuantificación de la proteína recombinante por ensayo de ELISA se determinó en una concentración conocida  
 729 de PTS de *C. reinhardtii* transformada (90 µg/ pocillo) y estandarizada contra una curva lineal de una  
 730 cantidad conocida del estándar de la proteína E-760 purificada de *C. reinhardtii*. La cantidad de proteína fue  
 731 expresada como el porcentaje de PTS. La absorbancia de las PTS de la cepa silvestre (WT) utilizada como  
 732 control fue casi igual a la del fondo de los pocillos de la placa. El ensayo se realizó con un anticuerpo dirigido  
 733 a la etiqueta de histidinas. Los valores son promedios de dos replicas con desviaciones estándar. WT, *C.*  
 734 *reinhardtii* sin transformar; E-760, *C. reinhardtii* transformada con E-760 no inducida; E-760SInd., *C.*  
 735 *reinhardtii* transformada con E-760S Inducida a 35°C / 10 min. Letras distintas indican diferencias  
 736 estadísticamente significativas entre tratamientos (P < 0.05).

737

738

739 **Fig. 8** Bacterial inactivation by TSP extracts of WT, E-760S and E-760S Induced.

740 — Ampicillin 0.3 mg/mL; — PB, potassium phosphate buffer 0.05 M pH 7; —\*— WT, *C. reinhardtii*  
 741 wild type strain 560 mg/mL TSP; —▲— E-760S, *C. reinhardtii* transgenic strain 560 mg/mL TSP; —▲— E-  
 742 760S, *C. reinhardtii* transgenic strain 1,120 mg/mL TSP; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* transgenic strain  
 743 Induced at 35 °C/10 min, 560 mg/mL TSP; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* transgenic strain Induced at 35  
 744 °C/10 min, 1,120 mg/mL TSP.

745

746 **Fig. 8.** Inactivación bacteriana por extractos de PTS de WT, E-760S y E-760S Inducida.

747 — Ampicilina 0.3 mg/mL; — PB, buffer fosfato de potasio 0.05 M pH 7; —\*— WT, *C. reinhardtii*  
 748 cepa silvestre 560 mg/mL PTS; —▲— E-760S, *C. reinhardtii* cepa transgénica 560 mg/mL PTS; —▲— E-  
 749 760S, *C. reinhardtii* cepa transgénica 1,120 mg/mL PTS; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* cepa transgénica  
 750 Inducida a 35°C /10 min, 560 mg/mL PTS; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* cepa transgénica Inducida a  
 751 35°C /10 min, 1,120 mg/mL PTS.

752

753

754

755

756

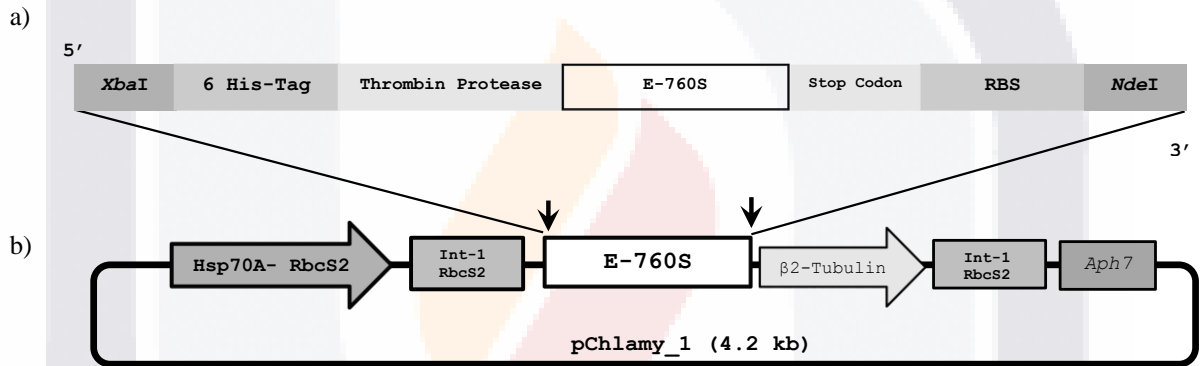
757 **Fig.1.**

5' ↓  
*Xba*I M H H H H H H L V P R G S N R W Y C N S A A G G V G G A  
 tctagaccatggtagcatcatcatcatcatcatcatttagttcctcgtggtagtaatogttggtattgtaattcagctgcaggtggtgttggtggtgct  
 A G C V L A G Y V G E A K E N I A G E V R K G W G M A G G F T H  
 gcaggttggtatttagctggttatgtaggtgaagctaaggaaaatattgcaggtgaagttcgttaagggttgggtatggctggtggtttcacacat  
 N K A C K S F P G S G W A S G - RBS *Nde*I  
 aataaggcatgtaagtcattcccaggttctggttgggcttcaggttaaaggaggacagcatatgccatgg  
 ↑ 3'

758

759

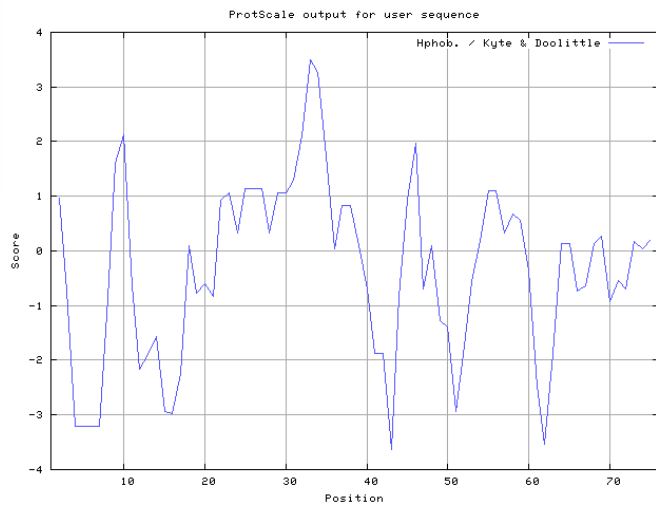
760 **Fig.2.**



761

762

763 **Fig.3.**



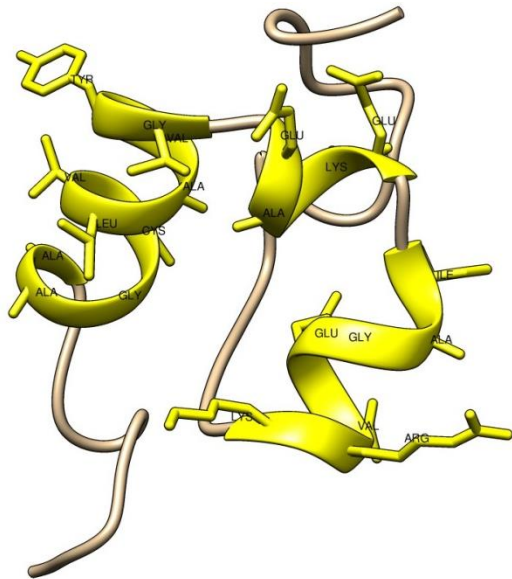
764

765 **Fig.4.**

```

E-760 -----NRW-----YCNSAAGGVGGAAVCGLAGYVGEAKENIAGEVRKGVGMAGGFTHNKACKSEPGSGWASG
amyL  MKQLNSEQLQNIIGGNRWITNAYS AALGCAVPGVKY GKKLGGVWGAVIGGVGGAAVCGLAGYVRKG-----
UP    MKQLNSEQLQNIIGGNRWITNAYS AALGCAVPGVKY GKKLGGVWGAVIGGVGGAAVCGLAGYVRKG-----
766    MKQLNSEQLQNIIGGNRWITNAYS AALGCAVPGVKY GKKLGGVWGAVIGGVGGAAVCGLAGYVRKG-----
          YCNSAA
    
```

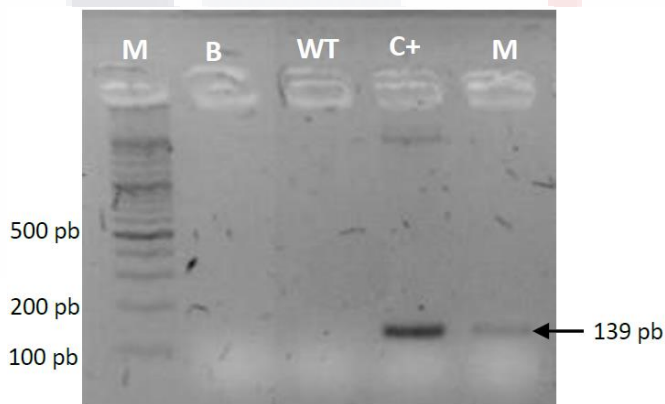
767 **Fig.5.**



768

769

770 **Fig.6.**



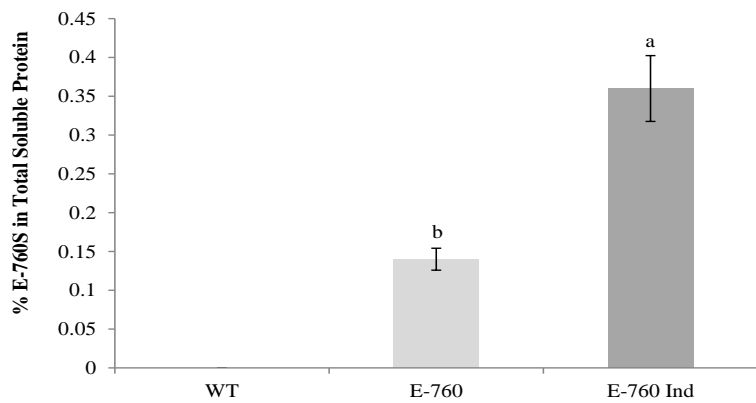
771

772

773

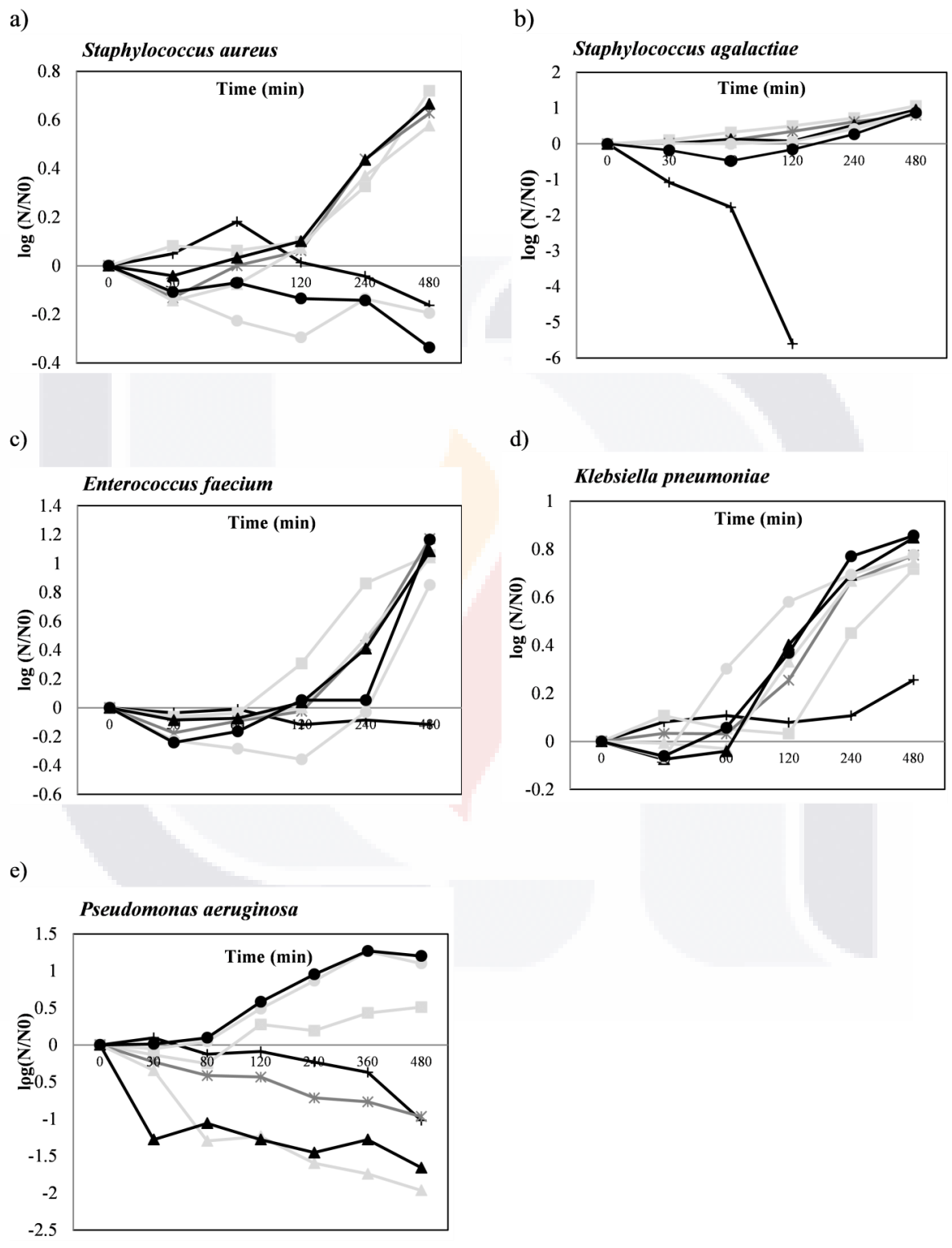
774

775 **Fig.7.**



776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792

793 Fig.8.





## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del presente trabajo de tesis se llevó a cabo con el esfuerzo y cooperación de un gran número de personas, que con su colaboración la hicieron posible.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por elegirme como becario (No. 266867) y apoyar mi formación profesional como investigador, en aras de promover y estimular el desarrollo de la ciencia y la tecnología en nuestro país.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por darme la oportunidad de formarme como investigador y por apoyar el desarrollo de mi trabajo de Tesis bajo el PIBT 14-1

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez por compartir sus conocimientos, apoyo y amistad además de todo lo necesario para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por su apoyo, asesoría y amistad para la culminación de esta investigación.

A la Dra. Nora Lilia Vasco Méndez por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez por las facilidades otorgadas en la estancia que realice en su laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y del Laboratorio de Toxicología Acuática (UAA) por compartir su tiempo, experiencias, frustraciones y aligerar el trabajo de laboratorio.

## DEDICATORIAS

A mi esposa e hijo:

Por ser un apoyo incondicional, por darme la familia que siempre anhelé, por alentarme a ser mejor persona, padre y profesionalista. A mi hijo le dedico este trabajo por ser mi alegría de cada día y por quien me esfuerzo para ofrecerle lo mejor que puedo...

A mis padres:

Por darme la vida y por apoyarme en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre me han apoyado y me han brindado todo su amor...

A mis hermanos y sobrinas:

Por estar conmigo y apoyarme siempre, por la alegría que cada día me dan con sus sonrisas y compañía, por ser mis mejores amigos...

A mi Escuela, Maestros, Amigos y Compañeros, quienes de alguna u otra forma, contribuyeron en mi formación académica...



## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
1. ANTECEDENTES .....	11
1.1. Péptidos antimicrobianos (PAMs).....	12
1.1.1. Clasificación de PAMs.....	12
1.1.2. Bacteriocinas.....	17
1.1.1.1. <i>Enterocina E-760</i> .....	18
1.2. Péptidos antimicrobianos reportados en <i>Moringa oleífera</i> .....	19
1.3. Expresión de Proteínas Recombinantes (PR).....	21
1.4. Plataformas de expresión .....	22
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	22
1.4.2. Microalgas.....	25
1.4.2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	26
1.4.2.2. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	28
1.5. <i>Moringa oleífera</i> Lam.....	30
2. JUSTIFICACIÓN .....	32
3. HIPÓTESIS.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1. Cepas de algas y bacterias, condiciones de cultivo.....	36
5.2. Diseño de las construcciones.....	37
5.2.1. Estrategia 1. Diseño del gen sintético codificante para la bacteriocina E-760 y construcción del plásmido.....	37
5.2.2. Estrategia 2. Unión de amplicones de <i>M. oleífera</i> .....	39
5.2.3. Estrategia 3. Diseño del gen sintético codificante para el péptido antibacteriano FLO de <i>M. oleífera</i> y construcción del plásmido.....	41

5.2.4.	Estrategia 4. Secuencia sintética denominada gBlock codificante para ambos péptidos antimicrobianos de <i>M. oleifera</i> .....	43
5.3.	Análisis <i>in silico</i> de las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas .....	45
5.4.	Transformación de microalgas y bacterias con las construcciones de interés.....	45
5.4.1.	Transformación de <i>C. reinhardtii</i> por vía nuclear .....	45
5.4.2.	Transformación de <i>C. vulgaris</i> vía cloroplasto.....	46
5.4.3.	Transformación de <i>E. coli</i> BL21 Star .....	47
5.5.	Selección de cepas recombinantes mediante PCR .....	48
5.5.1.	<i>C. reinhardtii</i> transformada con E-760 .....	48
5.5.2.	<i>C. vulgaris</i> transformada con FLOGS .....	49
5.5.3.	<i>E. coli</i> transformada con gBlock ( <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> + FLO).....	49
5.6.	Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes de interés .....	50
5.6.1.	Inducción de la expresión de la bacteriocina E-760 en <i>C. reinhardtii</i> .....	50
5.6.2.	Inducción de la expresión de proteínas quiméricas en <i>E. coli</i> .....	50
5.7.	Extracción y cuantificación de Proteína Total Soluble (PTS).....	50
5.7.1.	Extracción de PTS a partir de microalgas.....	50
5.7.2.	Extracción de PTS a partir de <i>E. coli</i> .....	51
5.8.	Purificación de la proteína recombinante E-760S .....	51
5.9.	Cuantificación de las proteína quiméricas E-760S y FLOGS mediante ensayo ELISA	52
5.10.	Evaluación de la actividad antibacteriana .....	53
5.10.1.	E-760S.....	53
5.10.2.	FLOGS .....	53
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	55
6.1.	Estrategia 1. Gen quimérico codificante para la bacteriocina E-760.....	55
6.1.1.	Análisis <i>in silico</i> del gen sintético E-760S .....	55
6.1.2.	Selección de <i>C. reinhardtii</i> núcleo transformantes y análisis por PCR .....	57
6.1.3.	Cuantificación por ELISA de la proteína expresada. ....	58
6.1.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de proteínas totales solubles (PTS) de <i>C. reinhardtii</i> transgénica y silvestre. ....	59

6.2.	Estrategia 2. Unión de amplicones de <i>M. oleifera</i> .....	63
6.2.1.	Búsqueda y análisis bioinformático de péptidos antimicrobianos en <i>M. oleifera</i>	63
6.2.2.	Amplificación de fragmentos de interés.....	64
6.2.3.	Estudio bioinformático de productos amplificados.....	65
6.2.4.	Clonación de los fragmentos de interés en los vectores pGEM-T Easy y pET 32	69
6.3.	Estrategia 3. Gen sintético FLOGS en <i>Chlorella vulgaris</i> .....	73
6.3.1.	Diseño de gen sintético FLOGS .....	73
6.3.2.	Selección de líneas transformantes de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	73
6.3.3.	Confirmación de la integración del gen sintético FLOGS en el genoma plasmídico de <i>C. vulgaris</i> .....	74
6.3.4.	Cuantificación por ELISA de la proteína recombinante FLOGS. ....	76
6.3.5.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de proteínas totales solubles (PTS) de <i>C. vulgaris</i> transgénica y silvestre. ....	78
6.4.	Estrategia 4. gBlock péptidos <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> – FLO.....	79
6.4.1.	Amplificación de fragmentos de interés por PCR y clonación en pGEM-T easy	79
6.4.2.	Confirmación de la ligación e integridad del ORF del gBlock en el vector pET32	80
6.4.3.	Análisis de expresión del gBlock en <i>Escherichia coli</i> BL21 Star. ....	83
7.	<b>DISCUSIONES</b> .....	84
8.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	95
9.	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	96



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades farmacológicas de las diferentes partes de <i>M. oleífera</i> Lam.....	31
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos diseñados para amplificación de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> y FLO.....	39
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos diseñados para amplificación del gBlock.....	44



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras tridimensionales de PAMs representativos de cada familia. ....	16
<b>Figura 2.</b> Estrategias para la obtención de péptidos antimicrobianos en diferentes plataformas ..	35
<b>Figura 3.</b> Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de E-760S. ....	38
<b>Figura 4.</b> Construcción pChlamy1 / E-760S.....	38
<b>Figura 5.</b> Estrategia para el empalme de amplicones de péptidos antimicrobianos en <i>M. oleifera</i>	40
<b>Figura 6.</b> Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de FLOGS. ....	42
<b>Figura 7.</b> Construcción FLOGS / p464. ....	42
<b>Figura 8.</b> Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de gBlock.....	44
<b>Figura 9.</b> Hidropaticidad de aminoácidos de E-760S .....	56
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de E-760, Am y UP .....	56
<b>Figura 11.</b> Estructura hipotética de la bacteriocina E-760.....	57
<b>Figura 12.</b> Análisis de PCR de transformantes de <i>C. reinhardtii</i> con primers específicos para el gen E-760S.....	58
<b>Figura 13.</b> Niveles de acumulación de la proteína recombinante E-760 en la línea transgénica evaluada .....	59
<b>Figura 14.</b> Inactivación bacteriana por extractos de PTS de WT, E-760S y E-760S Inducida .....	62
<b>Figura 15.</b> Hidropaticidad de aminoácidos de FLO .....	63
<b>Figura 16.</b> Hidropaticidad de aminoácidos de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> .....	64
<b>Figura 17.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR de <i>M. oleifera</i> .....	65
<b>Figura 18.</b> Resultados del alineamiento de la secuencia producto de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> con el oligonucleótido Forward.....	66
<b>Figura 19.</b> Modelado de la estructura terciaria del péptido <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> .....	67
<b>Figura 20.</b> Resultados del alineamiento de la secuencia producto de FLO con el oligonucleótido Forward .....	68
<b>Figura 21.</b> Modelado de la estructura terciaria del péptido FLO.....	69
<b>Figura 22.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción de las construcciones de interés con <i>EcoRI</i> .....	70
<b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar sentido de la ligación por restricción con <i>HindIII</i> y <i>SacI</i> .....	71

**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción con *EcoRI* de las construcciones de interés ..... 72

**Figura 25.** Selección de transformantes putativas de *C. vulgaris*. Crecimiento en medio TAP con espectinomicina (100 mg/L)..... 74

**Figura 26.** Gel de electroforesis al 1% de amplificación por PCR del gen FLOGS en 20 clonas putativas de *C. vulgaris* ..... 75

**Figura 27.** Resultados del alineamiento y análisis por Blastx de la secuencia producto de FLOGS con el oligonucleótido Forward ..... 76

**Figura 28.** Niveles de acumulación de la proteína recombinante FLOGS en las líneas transgénicas evaluadas de *C. vulgaris*..... 77

**Figura 29.** Análisis de funcionalidad de extracto de PTS que contiene la proteína recombinante FLOGS. .... 78

**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de PCR para amplificación del gBlock a dos temperaturas de alineamiento.. ..... 79

**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción con *EcoRI*..... 80

**Figura 32.** Secuencia producto de construcción gBlock/pET32 con oligonucleótido Forward. .... 81

**Figura 33.** Resultados de alineamiento y análisis por Blast n derivado de la secuenciación con el oligonucleótido T7 Forward. .... 82

**Figura 34.** Expresión de la proteína gBlock contenida en proteínas totales de *E. coli* BL 21 Star. ... 83

## RESUMEN

Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) son componentes indispensables de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos y actualmente son una alternativa para el combate de cepas bacterianas y fúngicas resistentes a los antimicrobianos convencionales. La producción de PAMs por vía recombinante es una opción viable para su obtención de forma masiva. En esta investigación se evaluó la expresión de algunos PAMs en las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* y en la bacteria *Escherichia coli*. Los péptidos sujetos a estudio fueron la bacteriocina E-760 que ha demostrado tener actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, los PAMs de *M. oleifera* Mo-CBP<sub>3</sub> (capacidad antifúngica) y FLO (efecto bactericida). El gen sintético E-760S fue insertado en el genoma nuclear de *C. reinhardtii* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. El rendimiento en la producción de E-760 recombinante fue de 0.14 a 0.36% del total de proteínas totales solubles (PTS) y mostró actividad inhibitoria moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. El gen sintético FLOGS fue insertado en el genoma plastidial de *C. vulgaris* por medio de biobalística. El rendimiento en la producción de FLOGS fue de 0.066 a 0.09% del total de PTS, no mostró ningún efecto inhibitorio contra las cepas bacterianas evaluadas. Se obtuvieron las construcciones con los péptidos Mo-CBP<sub>3</sub> y FLO en el vector pET32, así como la secuencia sintética denominada gBlock (Mo-CBP<sub>3</sub> + FLO) clonada en el vector pET32. Estos resultados demuestran que las microalgas *C. reinhardtii* y *C. vulgaris* funcionan como plataformas estables para la producción de proteínas terapéuticas importantes.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides (PAMs) are indispensable components of the innate defense mechanisms of living beings and are currently an alternative for combating bacterial and fungal strains resistant to conventional antimicrobials. The production of PAMs by recombinant way is a viable option to obtain them massively. In this research, the expression of some PAMs in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* and in the bacterium *Escherichia coli* were evaluated. The peptides under study were the bacteriocin E-760 that has been shown to have inhibitory activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, the PAMs of *Moringa oleifera* Mo-CBP<sub>3</sub> (antifungal capacity) and FLO (bactericidal effect). The synthetic gene E-760S was inserted into the nuclear genome of *C. reinhardtii* using *Agrobacterium tumefaciens*. The yield in the production of recombinant E-760 was 0.14 to 0.36% of total soluble protein (TSP) and showed moderate inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The synthetic gene FLOGS was inserted into the plastidial genome of *C. vulgaris* by biolistic via. The yield in the production of FLOGS was 0.066 to 0.09% of the total of TSP, did not show any inhibitory effect against the bacterial strains evaluated. The constructs were obtained with the peptides Mo-CBP<sub>3</sub> and FLO in the vector pET32, as well as the synthetic sequence called gBlock (Mo-CBP<sub>3</sub> + FLO) cloned in the vector pET32. These results demonstrate that microalgae *C. reinhardtii* and *C. vulgaris* function as stable platforms for the production of important therapeutic proteins.

## INTRODUCCIÓN

La actividad antimicrobiana se define como la capacidad que muestran algunos compuestos para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Dicha actividad es el principal criterio para el desarrollo de antibióticos, permitiendo el control de una amplia gama de enfermedades microbianas sistémicas y tópicas. Sin embargo, la efectividad de los antibióticos para controlar enfermedades infecciosas y el aumento de su disponibilidad gracias a su producción masiva, ha dado como resultado que su uso sea generalizado e inadecuado. Esto a su vez, ha producido una presión de selección, lo que conlleva al aumento de la resistencia a los antibióticos, aunado a esto, el incremento en la prevalencia de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos limita la capacidad de controlar dichas infecciones (Alanis, 2005). Debido a la problemática descrita, no es sorprendente que el desarrollo de compuestos eficaces para controlar las bacterias resistentes a los antibióticos se considere como uno de los desafíos médicos más importantes del siglo XXI. Una alternativa viable en el combate de microorganismos resistentes a los antibióticos es el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) (Ingham y Moore, 2007).

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son compuestos peptídicos endógenos con acción antibiótica y forman parte importante del sistema inmunitario innato de los seres vivos (Boman, 1995). Generalmente contienen menos de 50 aminoácidos de los cuales aproximadamente el 50% son hidrófobos y tienen una carga neta positiva debido a un exceso de residuos básicos. Los PAMs poseen dos propiedades atractivas que son: a) amplia gama de actividades antimicrobianas y b) se dirigen principalmente a las membranas microbianas, lo que impide la capacidad de los microbios para desarrollar resistencia contra ellos. Como resultado, se cree que estos péptidos son candidatos prometedores como alternativa para los antibióticos actuales (Hancock y Sahl, 2006).

Sin embargo, antes de que los PAMs puedan ser evaluados en ensayos clínicos deben abordarse una serie de cuestiones fundamentales como sus mecanismos de acción, su eficacia y su seguridad. Para responder estas preguntas se requieren amplios estudios



funcionales y estructurales, cuyo progreso se basa parcialmente en la disponibilidad de péptidos puros. Además, la disponibilidad de péptidos es uno de los principales factores que determinan su viabilidad de uso generalizado como antibióticos. Por consiguiente, tanto la investigación básica como las aplicaciones clínicas requieren de péptidos de alta calidad y además que estén disponibles de manera rentable. En general, el aislamiento de PAMs a partir de fuentes naturales es un proceso que requiere mucho trabajo y tiempo, y por lo tanto no proporciona un método eficiente de obtención de péptidos en grandes cantidades. La síntesis química, aunque muy eficiente, es un proceso complejo y costoso (Andersson *et al.*, 2000) por lo tanto, tampoco es una plataforma ideal para la producción de péptidos a gran escala. Afortunadamente, la tecnología de ADN recombinante proporciona un medio económico para la fabricación de proteínas. De hecho, muchos PAMs se han obtenido con éxito a través de su producción por vías recombinantes en varios hospedadores heterólogos (Ingham y Moore, 2007). Entre los sistemas disponibles para la producción de proteínas recombinantes, se encuentran *Escherichia coli* que ha sido el huésped más utilizado, además de levaduras, microalgas, plantas, líneas celulares de insectos y animales.

Por todo lo anterior, en el presente estudio se evaluó la funcionalidad de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* y de *Enterococcus sp.* así como la eficiencia de producción de los PAMs de interés utilizando a la bacteria *Escherichia coli*, y a las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* como plataformas de expresión.

## 1. ANTECEDENTES

El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema prioritario para las agencias mundiales de la salud, tal es el caso de la World Health Organization (WHO) que en 2014 en su informe global sobre la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, mencionó que la sociedad se encuentra en una era "post-antibiótica" y que la crisis de la resistencia antimicrobiana es cada vez más grave (WHO, 2014). En respuesta a esta problemática global se han propuesto estrategias para el combate a la resistencia microbiana, una de estas es la síntesis y uso de PAMs ya sean naturales o sintéticos que podrían ser un modelo para el diseño y creación de nuevas clases funcionales de antibióticos (Tillotson y Theriault, 2013). La biosíntesis de PAMs utilizando técnicas de ADN recombinante en sistemas de producción heterólogos hace posible la producción masiva de proteínas quiméricas con capacidades farmacológicas importantes, lo cual viene a resarcir problemas como el bajo rendimiento de PAMs obtenidos de fuentes naturales así como los altos costos de producción, purificación o síntesis por métodos químicos y bioquímicos (Parachin *et al.*, 2012, Arbulu *et al.*, 2015). Entre los organismos modificados que actúan como "reactores biológicos" capaces de sintetizar proteínas recombinantes se encuentran bacterias, levaduras, microalgas, insectos, plantas y mamíferos, así como líneas celulares derivadas de los tres últimos. Cada sistema de producción posee diferentes características en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción, por lo que cada uno tiene diferentes ventajas y desventajas. Por todo lo anterior, el presente proyecto pretende obtener PAMs reportados en *Moringa oleifera* y *Enterococcus sp.* utilizando diferentes técnicas moleculares así como diferentes plataformas de expresión (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Escherichia coli*) y analizar su funcionalidad frente a microorganismos patógenos (bacterias y hongos).

## 1.1. Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son componentes indispensables de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos, son oligopéptidos de entre 2 a 9 kDa con una longitud de 10-50 residuos de aminoácidos, presentan una estructura helicoidal de naturaleza catiónica y anfipática o hidrofóbica, lo que facilita la interacción inicial con la membrana bacteriana que está cargada negativamente, dañándola y provocando la muerte celular (Hassan *et al.*, 2012, Nawrot *et al.*, 2014), además estos péptidos muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos, virus y parásitos eucariotas (Zhao *et al.*, 2013).

Hasta la fecha, más de 5,000 PAMs han sido descubiertos o sintetizados. Tanto procariontas como eucariotas pueden sintetizar PAMs de manera natural, estos péptidos son la primera línea de defensa constitutiva inducida por una infección de agentes nocivos, deteniendo a la mayoría de las infecciones antes de que causen algún síntoma (Bahar y Ren, 2013). A diferencia de los antibióticos convencionales, que en general, se dirigen hacia una enzima y pueden selectivamente inducir resistencia, los PAMs inhiben microorganismos principalmente por mecanismos de formación de poros dirigidos a la membrana, un mecanismo que es inherentemente más difícil para que estos desarrollen algún tipo de resistencia (Wang, 2015).

### 1.1.1. Clasificación de PAMs.

Hay numerosas clasificaciones de PAMs con base en criterios como, la maquinaria biosintética productora, la fuente biológica productora, la función biológica del péptido, la estructura tridimensional y a los objetivos moleculares a atacar (Wang, 2015).

#### ***Con base en la maquinaria biosintética productora.***

Algunos PAMs son sintetizados por sistemas enzimáticos múltiples (por ejemplo algunos PAMs son liberados tras la proteólisis de la glicoproteína Lactoferrina por medio

de diversas enzimas proteolíticas), mientras que la mayoría de los PAMs son codificados por genes (Sinha *et al.*, 2013; Wang, 2015).

***Con base en la fuente biológica productora.***

PAMs bacterianos (bacteriocinas), PAMs de plantas, PAMs de animales (insectos, anfibios, peces, reptiles, mamíferos, etc.) basándose en los nombres de las familias fuente. Las familias principales y mejor estudiadas de PAMs en el reino animal son las catelicidinas, defensinas e histatinas (Wang, 2015).

***Con base en las funciones biológicas.***

**PAMs antivirales.** Los PAMs antivirales neutralizan los virus al integrarse a la envoltura viral o a la membrana de la célula hospedera causando su inestabilidad, lo que propicia que los virus no puedan infectar las células del huésped. También pueden reducir la unión de virus a las células huésped. Por ejemplo, las defensinas se unen a las glicoproteínas virales haciendo que los virus del herpes simple (VHS) no puedan unirse a la superficie de las células del huésped. Además de la interrupción de las envolturas virales y el bloqueo de los receptores virales, algunos PAMs pueden evitar que las partículas virales ingresen a las células hospedadoras al ocupar receptores específicos en células de mamíferos (Bahar y Ren, 2013).

**PAMs antibacterianos.** Los péptidos antibacterianos son los PAMs más estudiados hasta la fecha y la mayoría de ellos son catiónicos, dirigiéndose a la membrana celular bacteriana provocando la desintegración de la estructura de la bicapa lipídica. La mayoría de estos péptidos son anfipáticos con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que les proporciona la capacidad de unirse a los componentes lipídicos (región hidrofóbica) y a los grupos de fosfolípidos (región hidrófila). De forma interesante, se ha demostrado que algunos PAMs a bajas concentraciones pueden matar bacterias sin cambiar la integridad de las membranas, gracias a la inhibición de algunas vías importantes dentro de la célula

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la buforina II puede difundirse en las células y unirse al ADN o ARN sin dañar la membrana celular (Bahar y Ren, 2013).

**PAMs antifúngicos.** Al igual que los PAMs antibacterianos, los péptidos antifúngicos pueden matar hongos al dirigirse a la pared celular o a los componentes intracelulares. Sin embargo, la membrana celular bacteriana y la pared celular de hongos tienen diferentes contenidos. La quitina es uno de los principales componentes de las paredes celulares de los hongos y algunos de los péptidos antifúngicos son capaces de unirse a la quitina. Tal capacidad de unión ayuda a los PAMs a atacar las células fúngicas de manera eficiente. Los PAMs dirigidos a la pared celular matan a las células diana debido a una alteración de la integridad de las membranas fúngicas, al aumento de la permeabilización de la membrana plasmática o a la formación de poros directamente. Aunque la mayoría de los PAMs antifúngicos tienen aminoácidos polares y neutros en sus estructuras, no parece haber una correlación clara entre la estructura del PAM y el tipo de células a eliminar (Bahar y Ren, 2013).

**PAMs antiparasitarios.** Los PAMs antiparasitarios son un grupo más pequeño en comparación con otras tres clases de PAMs. Aunque algunos microorganismos parásitos son multicelulares, el modo de acción de los péptidos antiparasitarios es el mismo que el de otros PAMs, ya que matan a las células al interactuar directamente con la membrana celular. Ejemplos de este tipo de péptidos es la magainina, que puede matar a *Paramecium caudatum*, la catelicidina capaz de matar a *Caenorhabditis elegans* formando poros en la membrana celular, la cecropina sintética eficaz contra el parásito *Leishmania* (Bahar y Ren, 2013).

***Con base en su estructura tridimensional.***

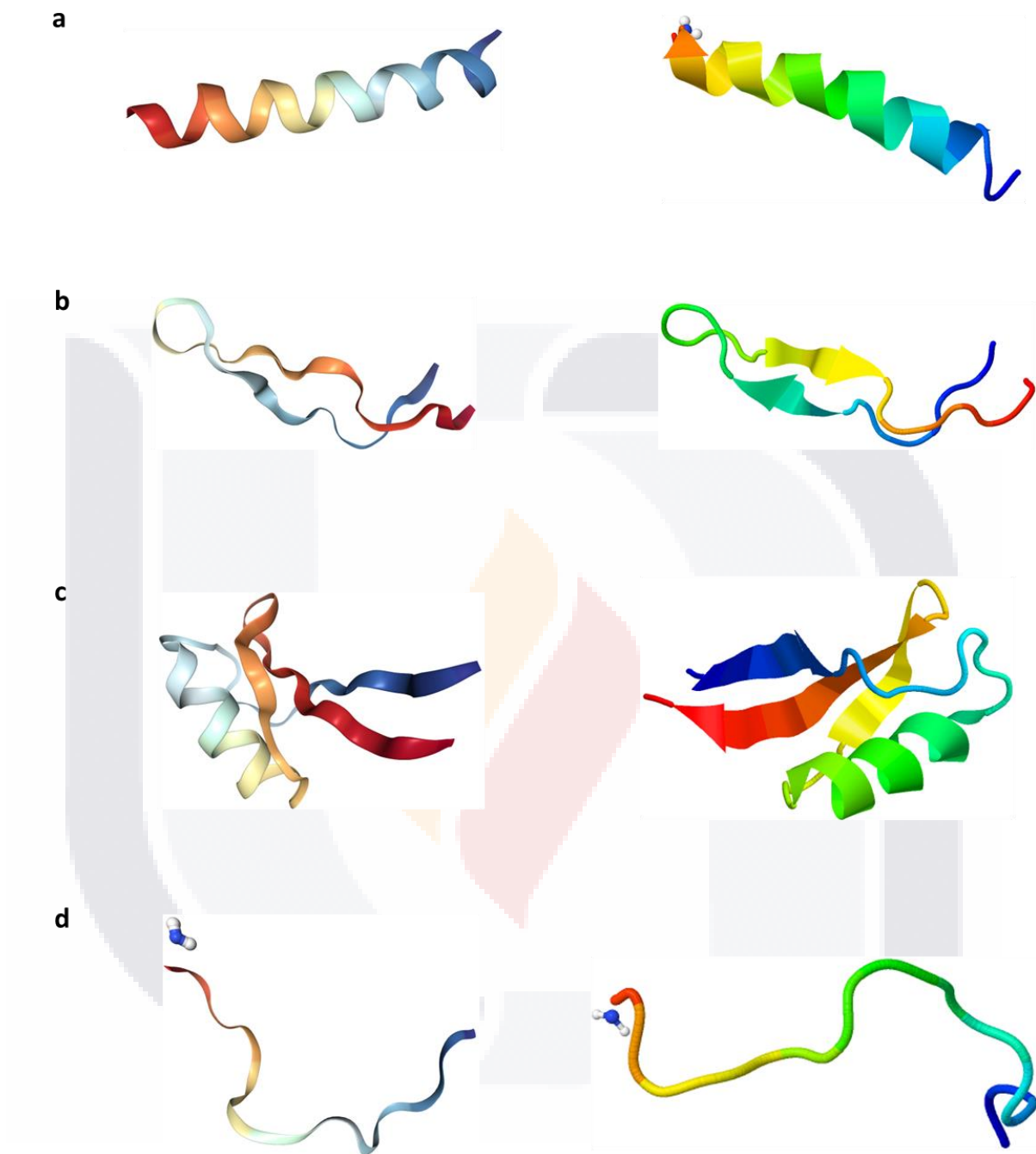
Con base en este criterio los PAMs se clasifican en 4 familias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha\beta$  y no  $\alpha\beta$  (Figura 1 a-d) de acuerdo a los tipos de estructuras tridimensionales que presentan. La

familia  $\alpha$  consiste de PAMs con estructuras helicoidales (por ejemplo magaininas y LL-37). La familia  $\beta$  está compuesta por PAMs con estructuras de cadenas  $\beta$  (por ejemplo alfa defensinas humanas). Por su parte la familia  $\alpha\beta$  comprende las estructuras tridimensionales antes mencionadas (helicoidales y  $\beta$  plegadas), un ejemplo de esta familia son las beta defensinas. La familia no  $\alpha\beta$  (no alfa beta) no contiene cadenas helicoidales ni beta (por ejemplo la indolicidina) (Wang, 2015).

***Con base en los objetivos moleculares.***

Los PAMs pueden clasificarse ampliamente en dos familias: péptidos cuyo objetivo es la superficie celular (por ejemplo, nisinas y temporinas) y péptidos con objetivos intracelulares (como péptidos ricos en Prolina). Los péptidos dirigidos a la superficie celular incluyen tanto péptidos dirigidos a membrana como no dirigidos a membrana y pueden incluso subdividirse más según los objetivos específicos como pared celular/ carbohidratos, lípidos / membranas y proteínas / receptores. Del mismo modo, los PAMs con objetivos intracelulares pueden clasificarse adicionalmente en base a las moléculas diana específicas (por ejemplo, proteínas, ADN y ARN) (Wang, 2015).





**Figura 1.** Estructuras tridimensionales de PAMs representativos de cada familia.

- a) Familia  $\alpha$ . Magainina 2 de la rana *Xenopus laevis* (Acceso PDB: 2MAG).
- b) Familia  $\beta$ . Lactoferricina B del bovino *Bos Taurus* (Acceso PDB: 1LFC).
- c) Familia  $\alpha\beta$ . Defensina vegetal Psd1 de *Pisum sativum* (Acceso PDB: 1JKZ).
- d) Familia no  $\alpha\beta$ . Indolicidina bovina de *Bos Taurus* (Acceso PDB: 1G89).

### **1.1.2. Bacteriocinas**

Los PAMs sintetizados por bacterias se denominan bacteriocinas y son péptidos sintetizados ribosomalmente de tamaño pequeño (30-60 aminoácidos), de naturaleza catiónica, termo estables (100 °C por 10 min), activos y altamente específicos contra bacterias muy relacionadas al organismo productor (espectro estrecho) o contra bacterias de otro género (amplio espectro) (Nissen-Meyer y Nes 1997, Cotter *et al.*, 2005). A diferencia de las bacteriocinas, los PAMs eucariotas generalmente suelen ser menos específicos ya que poseen un espectro de acción más amplio abarcando mayor diversidad de bacterias (Gram positivas y negativas) (Lüders *et al.*, 2003, Hassan *et al.*, 2012). Las bacterias productoras de PAMs son inmunes a sus propias bacteriocinas, debido a la síntesis de proteínas de inmunidad específica (Cotter *et al.*, 2005). El grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) es uno de los principales productores de bacteriocinas y de los más estudiados debido a que la mayoría de estas bacterias son aisladas de fuentes alimentarias, por lo que se consideran como bacterias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, Generally Recognized As Safe) (Woraprayote *et al.*, 2016). El grupo de las BAL es común encontrarlo en materia orgánica en descomposición, en productos lácteos, carne y pescado fermentados, cereales, remolachas, verduras encurtidas, patatas, aguas residuales y en las cavidades de humanos y animales. Los géneros que conforman a las BAL incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, siendo *Lactobacillus* el género más grande (Mokoena 2017).

#### **1.1.2.1. Clasificación**

Las bacteriocinas se clasifican con base en sus estructuras primarias, pesos moleculares, modificaciones post-traduccionales y características genéticas. No obstante no hay un esquema de clasificación absoluta de las bacteriocinas producidas por las BAL, pero recientemente autores han coincidido en una clasificación que incluye tres clases.

*Bacteriocina Clase I.* Denominadas lantibióticos y se caracterizan en función de su modificación post-traducciona, lo que da como resultado la formación de aminoácidos inusuales como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina, dehydroalanina, dehydrobutirina y D-alanina. Los péptidos nisina y lactocina son los representantes de esta clase (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Mokoena 2017).

*Bacteriocina Clase II.* Son péptidos pequeños (<10 kDa), termoestables, catiónicos e hidrofóbicos, que no sufren modificaciones post-traduccionales. A su vez se subdividen en Clase IIa y Clase IIb. La clase IIa se caracteriza por presentar un motivo YGNGVxC (donde V puede ser reemplazada por L en algunos casos) en la región *N*-terminal del péptido (Cotter *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014). Bacteriocinas como pediocina PA1 y leucocina A son ejemplos de este tipo de PAMs. La característica esencial de la clase IIb es que requieren la actividad sinérgica de dos péptidos complementarios para ejercer una actividad antimicrobiana efectiva, ejemplo de este tipo de péptidos son plantaricina A y enterocina X (Mokoena 2017). Una característica estructural interesante de todas las bacteriocinas de clase IIb es la presencia de motivos GxxxG (donde x representa cualquier residuo) y motivos tipo GxxxG [conformados por A (AxxxA) o S (SxxxS)] que facilitan las interacciones hélice-hélice y promueven la oligomerización de péptidos helicoidales transmembranales o dominios de proteínas de membrana (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Kyriakou *et al.*, 2016).

*Bacteriocinas Clase III,* consisten en proteínas grandes (> 30kDa) termolábiles, con helveticina J y enterolisina A como ejemplo (Mokoena 2017).

#### **1.1.2.2. Enterocina E-760**

Line *et al.*, (2008) aislaron y purificaron por métodos bioquímicos y químicos una bacteriocina denominada como enterocina E-760 proveniente del genero *Enterococcus*. Este péptido tiene 62 residuos de aminoácidos, con un peso de 5.362 kDa, es termoestable, tiene un pI de 8.7, es estable a pH de 5.0 a 8.7 y posee un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y

*Listeria monocytogenes*) y Gram negativas (diversas sero variedades de *Salmonella* entérica, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter jejuni*). La capacidad de E-760 para inhibir el crecimiento de una cantidad de patógenos transmitidos por los alimentos, incluyendo salmonelas y campilobacters, sugiere que esta enterocina puede ser una herramienta útil en la producción de alimentos así como en la reducción de las poblaciones de patógenos *in vivo*.

## **1.2. Péptidos antimicrobianos reportados en *Moringa oleífera*.**

A la fecha se han reportado dos PAMs en *Moringa oleífera* Lam.: 1) el polipéptido antibacteriano y floculante denominado FLO (Gassenschmidt *et al.*, 1995 y Suarez *et al.*, 2003) y 2) el péptido antifúngico denominado Mo-CBP<sub>3</sub> (Gifoni *et al.*, 2012).

Gassenschmidt *et al.*, (1995), a partir de semillas de *Moringa oleífera* aislaron y purificaron una proteína con propiedad floculante por medio de cromatografía de intercambio catiónico a la que denominaron MO 2.1. En ensayos para evaluar la actividad floculante de dicha proteína, se encontró con actividad coagulante altamente específica y su efecto fue comparable con el polímero sintético 544K, que es un agente floculante eficaz utilizado para concentrar biomasa de organismos unicelulares y filamentosos (Pushparaj *et al.*, 1993). La proteína puede utilizarse en un amplio rango de concentración (0.4-1.2 mg/mL) para minimizar el número de partículas mientras que la dosis óptima del polímero 544K fue en un rango de ~0.15 mg/mL.

Broin *et al.*, (2002) produjeron por vía recombinante en *Escherichia coli* la proteína MO 2.1 con actividad floculante reportada por Gassenschmidt *et al.*, (1995) utilizando el cDNA codificante para dicha proteína y evaluaron la actividad floculante de la proteína quimérica purificada utilizando bacterias que sobreexpresan la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein) y microscopía confocal. Encontraron que Mo 2.1 recombinante fue efectiva al formar agregados de partículas de arcilla montmorillonita así

como de bacterias como *Pseudomonas brassicacearum* (gram negativa) y *Paenibacillus* (gram negativa). Por lo que estas proteínas podrían ser utilizadas en el tratamiento de aguas industriales.

Suarez *et al.*, (2003) por métodos recombinantes expresaron en *E. coli* el polipéptido Mo 2.1 de *M. oleifera* (Gassenschmidt *et al.*, 1995) al cual denominaron FLO y evaluaron su actividad floculante y antibacteriana. En cuanto a rendimiento de sobre expresión y recuperación de la proteína recombinante purificada, reportaron 1 mg de proteína por litro de cultivo, lo cual se considera un rendimiento alto, por su parte los resultados de la prueba de coagulación de micro partículas de vidrio y bacterias mostraron una actividad de coagulación muy eficaz. La actividad bactericida fue evaluada contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *L. pneumophila* registrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de entre 0.8 y 5 mg/mL de FLO, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 2 hasta >de 10 mg/mL.

Suarez *et al.*, (2005), con base en la estructura que presenta el péptido antibacteriano FLO (Gassenschmidt *et al.*, 1995) caracterizaron su función por medio de un modelado conformacional del péptido y se acopló a un análisis funcional de derivados sintéticos. Encontraron que los determinantes estructurales parcialmente superpuestos median la sedimentación y la actividad antibacteriana. Para lograr la sedimentación se requiere de una porción del péptido rica en glutamina cargada positivamente la cual forma agregados de células bacterianas. La actividad bactericida por daño a membrana se localizó en una secuencia propensa a formar un motivo estructural hélice-bucle-hélice. Además demostraron que el ensamblaje de múltiples copias de este motivo estructural en un péptido ramificado incrementa la actividad antibacteriana, ya que bajas concentraciones eliminan de manera efectiva bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* sin mostrar un efecto tóxico en glóbulos rojos humanos.

Gifoni *et al.*, (2012) aislaron a partir de semillas de *M. oleifera* una proteína termoestable de unión a quitina (a la que denominaron Mo-CBP<sub>3</sub>) por medio de cromatografía de afinidad a quitina seguida de una cromatografía de intercambio iónico.

Mo-CBP<sub>3</sub> presentó actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* y *C. gloesporoides* a una concentración de 0.1 mg/mL. Estos resultados sugieren que Mo-CBP<sub>3</sub> podría estar involucrado en mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de hongos patógenos.

### **1.3. Expresión de Proteínas Recombinantes (PR)**

La producción de Proteínas Recombinantes (PR) es una tecnología que surgió a mediados de 1970 y respondió a una necesidad de proveer proteínas de uso terapéutico con un abasto asegurado que no dependiera de fuentes animales y de calidad constante. La demanda de producción de este tipo de proteínas difícilmente se podría satisfacer de no ser por la tecnología del ADN recombinante (ADNr), mediante la cual se ha logrado la manipulación genética de diversos organismos para producir una mayor cantidad de proteínas de interés médico que la que se podría obtener de las fuentes naturales originales (Rivera-Solís *et al.*, 2011).

La fase inicial “upstream” (río arriba) de producción de PR consiste en el diseño del sistema de expresión que implica la elaboración mediante ingeniería genética del vector de clonación y del gen que codifica para la proteína de interés en la célula hospedera adecuada. La segunda fase “downstream” (río abajo) se enfoca al proceso de purificación, evaluación del control de calidad y validación de dicho producto. En términos generales, la producción de PR sigue el siguiente esquema: 1) tratamiento con enzimas de restricción de un vector de clonación y del ADN que contiene el gen que codifica para la proteína de interés, 2) ligamiento del gen con el vector para obtener el ADNr, 3) internalización y replicación (clonación) del ADNr en una célula hospedera y 4) expresión de la proteína en el hospedero (Kleinberg y Mosdell, 2004).

Un vector es una molécula de ADN que transportará al fragmento de interés y permitirá su multiplicación utilizando la maquinaria celular de la célula huésped. Los vectores de clonación más utilizados derivan del genoma viral o de plásmidos bacterianos,



siendo los más usuales los plásmidos (moléculas de DNA extracromosómicas de doble cadena presentes en bacterias) y los bacteriófagos (virus que infectan exclusivamente a bacterias). Sin embargo existen otros tipos de vectores como los cósmidos (vectores híbridos, que combinan las características ventajosas de los plásmidos bacterianos y del fago  $\lambda$ ), los fásmidos [vectores que combinan las características de un fago filamentoso (M13) y un plásmido (pBR323) y que contienen tanto el origen de replicación del fago como del plásmido] y los cromosomas artificiales (desarrollados con el objetivo de clonar grandes segmentos de cromosomas eucarióticos). Un vector de clonación tiene tres componentes esenciales: 1) un origen de replicación, 2) un gen marcador fácilmente seleccionable y 3) al menos un sitio único de restricción (Garbus *et al.*, 2010).

Entre los organismos modificados que actúan como “reactores biológicos” capaces de sintetizar PR se encuentran la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como líneas celulares de insectos (SCI-B), de plantas y de mamíferos [BHK (Baby Hamster Kidney), CHO (Chinese Hamster Ovary), HEK293 (Human Embryonic Kidney)] (Jarvis, 2009; Grabenhorst *et al.*, 1999; Thomas y Smart, 2005; Friesen y An, 1983; Condon *et al.*, 2003). Cada sistema de producción posee diferentes características en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción, por lo que cada uno tiene diferentes ventajas y desventajas (Rivera-Solís *et al.*, 2011).

## **1.4. Plataformas de expresión**

### **1.4.1. *Escherichia coli***

El hospedero bacteriano más importante para la producción de PR es la bacteria *Escherichia coli*, ya que presenta una serie de ventajas importantes dentro de las cuales se pueden mencionar: i) su genoma es conocido desde hace varios años, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, ii) existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo, iii) se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de PR, iv) puede crecer rápido en medios muy simples, con altos niveles de producción de PR y v) son ideales para producir

proteínas de tamaño pequeño que no requieran modificaciones post-traduccionales. Actualmente, cerca del 30 % de las PR de uso terapéutico son producidas empleando *E. coli* (Ferrer–Miralles *et al.*, 2009; Díaz-Martínez y Martos, 2010).

Si bien *E. coli* muestra varias ventajas en la producción de PR, al ser un organismo procariota es evidente que presentará algunas desventajas en comparación con hospederos eucariotas, sus principales desventajas son: i) no es un organismo idóneo para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores ya que éstas proteínas a menudo muestran plegamientos complejos que incluyen numerosos puentes disulfuro o que necesitan la intervención de chaperonas celulares en el plegamiento, características no presentes en los procariotas, ii) muchas de estas proteínas requieren para su función modificaciones post-traduccionales, que no pueden llevarse a cabo en organismos procariotas, un ejemplo de ello es la glicosilación, esencial para la función de muchas proteínas eucariotas, iii) no es un eficiente secretor de proteínas al medio de cultivo y iv) su habilidad para promover la formación correcta de numerosos puentes disulfuro es limitada. Pese a estas desventajas, numerosas proteínas complejas se obtienen en este hospedero con la actividad biológica requerida para ser utilizadas (Díaz - Martínez y Martos, 2010; Santana *et al.*, 1999).

Entre los parámetros más importantes en la producción exitosa de proteínas recombinantes en *E. coli* se encuentran: la eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad del vector de expresión y de los ácidos ribonucleicos (ARN) (transcritos), la estabilidad de las moléculas ante el ambiente proteolítico del hospedero y la localización y plegamiento de la proteína (Jonasson *et al.*, 2002).

La expresión de PR mediante este sistema bacteriano requiere de vectores específicos, de los cuales existe una gran variedad con una gran diversidad genética que facilitan la localización y purificación de la proteína expresada. El gen de interés puede ser insertado a la secuencia del ADN plasmídico para formar un híbrido o plásmido recombinante que es capaz de replicarse y ser expresado en las bacterias puesto que presentan secuencias de iniciación de la replicación, promotores de la transcripción, regiones de iniciación de la traducción así como secuencias de terminación de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

transcripción y traducción reconocidos por la maquinaria bacteriana. Los plásmidos recombinantes formados son introducidos en las bacterias por diversos procedimientos tales como: el método de sales (generalmente,  $\text{CaCl}_2$ ), polietilenglicol y electroporación, que se fundamentan en la formación de poros en la membrana y pared celular para permitir la entrada del material genético hacia el interior de la célula (Baneyx, 1999; Peredelchuk y Bennet, 1997).

Por otra parte, la expresión de proteínas heterólogas en estas bacterias requiere que el vector presente un promotor transcripcional fuerte e inducible para controlar la expresión del gen a un alto nivel. El promotor transcripcional más comúnmente utilizado es el operón Lac que consta de tres genes *LacZ*, *LacY* y *LacA*. Cuando las células crecen en un medio mínimo en presencia de glucosa, la transcripción es bloqueada por el represor Lac (producto del gen *LacI*) el cual se une a un único sitio río arriba del gen *LacZ* y evita que la RNA polimerasa transcriba los genes *LacZ*, *LacY* y *LacA*, de los cuales dos de estos productos son necesarios para el crecimiento de la bacteria en presencia de lactosa (Sørensen y Mortensen, 2005).

Los marcadores de resistencia más comúnmente utilizados en los vectores de expresión confieren resistencia a diversos antibióticos como: ampicilina (al expresarse la enzima  $\beta$ -lactamasa la cual es secretada al periplasma en donde cataliza la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico); kanamicina (la cual es modificada e inactivada en el periplasma por la actividad de la aminoglucósido fosfotransferasa); cloranfenicol [(el cual es modificado por el producto del gen *CAT* (cloranfenilcol acetiltransferasa) que acetila los grupos hidroxilo y previene su unión al ribosoma)] y tetraciclina (el cual es hidrolizado por el producto de varios genes) (Sørensen y Mortensen, 2005).

Otro factor fundamental que se debe tener en cuenta para la expresión de proteínas recombinantes es la cepa de *E. coli* huésped, puesto que se debe caracterizar por tener una baja expresión de proteasas a fin de evitar la degradación de la proteína de expresión. La cepa de *E. coli* que es generalmente utilizada en estos protocolo es la cepa BL21(DE3), la cual se caracteriza por alcanzar una alta densidad óptica, no es patogénica y es deficiente en la expresión de ompT y Lon, dos proteasas una extracelular y la otra

intracelular, respectivamente, que pueden degradar la proteína de interés (Sørensen y Mortensen, 2005).

#### **1.4.2. Microalgas**

Las microalgas representan un grupo de diversos organismos fotosintéticos, unicelulares y eucariotas, presentes en una amplia gama de hábitats. En comparación con las plantas terrestres, son más eficientes para convertir la luz solar en energía química; por lo tanto, son particularmente atractivas para la producción de lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y otros bioactivos (Markou y Nerantzis, 2013). En los últimos años, se ha dado un aumento en el interés por la biotecnología microalgal para producir moléculas valiosas que van desde proteínas terapéuticas hasta biocombustibles. Numerosas especies de microalgas pueden sintetizar compuestos valiosos de forma natural, lo que los convierte en una fuente potencialmente importante de productos químicos que se aplican en las industrias de alimentos, nutrición, cosméticos y farmacéutica. Además, algunas especies de microalgas pueden transformarse eficazmente, lo que permite aumentar la productividad de los compuestos naturales mediante la ingeniería metabólica. Al igual que las bacterias, levaduras, plantas superiores y otros sistemas de expresión, las microalgas también pueden manipularse para expresar genes heterólogos para la producción de proteínas recombinantes que tienen un valor importante en aplicaciones farmacéuticas industriales. Hasta la fecha, algunas proteínas de origen mamífero como anticuerpos, hormonas y vacunas, se han expresado en microalgas a niveles económicamente viables (Gong *et al.*, 2011).

Las microalgas tienen varias ventajas en comparación con otros sistemas de expresión, entre las que se pueden mencionar: 1) Las microalgas comúnmente duplican su biomasa dentro de 24 h y hay un período de tiempo relativamente corto (generalmente unas pocas semanas) desde la generación de transformantes microalgales iniciales hasta la escala a volúmenes suficientes para la producción a gran escala; 2) Las proteínas

recombinantes pueden expresarse a partir de genomas nucleares, cloroplásticos y mitocondriales de algunas especies de microalgas. A diferencia de las bacterias, las microalgas poseen vías complejas de modificación post-traducciona, y por lo tanto las microalgas pueden producir proteínas glicosiladas (Gong *et al.*, 2011); 3) Las microalgas pueden crecer de forma fotoautótrofa o de forma heterótrofa. Las microalgas transgénicas son adecuadas para el crecimiento en fotobiorreactores cerrados, en los que las condiciones de cultivo como luz, temperatura y nutrientes pueden controlarse de buena manera. El cultivo de microalgas transgénicas en fotobiorreactores también puede evitar que los transgenes se escapen al medio ambiente, lo que potencialmente puede ocurrir en las plantas superiores por medio del polen (Janssen *et al.*, 2003); 4) Algunas especies de microalgas han sido reconocidas como fuente de alimento comestible y catalogadas como GRAS (Generalmente Reconocidas Como Seguras). Las microalgas productoras de proteínas terapéuticas u otros compuestos valiosos pueden ser potencialmente fuentes de administración oral como algas liofilizadas en polvo con poca o ninguna purificación (Mayfield *et al.*, 2007). Estas ventajas hacen que los sistemas de microalgas sean atractivos para la producción de proteínas recombinantes y otros compuestos de alto valor.

Se han obtenido logros prometedores en la ingeniería genética de varias microalgas, incluidas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sp.*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochloropsis sp.* (Gong *et al.*, 2011).

#### **1.4.2.1. *Chlamydomonas reinhardtii***

Recientemente, las microalgas verdes y en particular la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, han surgido como una alternativa atractiva para la producción de PR, debido principalmente a: 1). Cultivo fácil y económico, ya que presentan una rápida generación de líneas transgénicas estables, 2). Poseen promotores y elementos de expresión simples, 3). A su gran capacidad para acumular biomasa, 4). A su corto tiempo de reproducción (puede duplicar el número de células en aproximadamente 8 h bajo un régimen de 12 h

luz: 12 h oscuridad), 5). A su capacidad para sintetizar proteínas complejas de origen humano y, 6). A que son consideradas generalmente como inocuas para el hombre (Rivera-Solís *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2002).

En el caso de proteínas terapéuticas humanas, la ausencia de glicosilación en el cloroplasto puede mejorar la eficacia y seguridad de algunas proteínas terapéuticas. Por ejemplo, extensos experimentos preclínicos *in vitro* demostraron que los anticuerpos recombinantes aglicosilados conservan actividad biológica, tienen tasas de eliminación similares a las de proteínas glicosiladas, y no provocan respuestas inmunes no deseadas (Friend *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 2002).

*C. reinhardtii* es la única microalga para cuya manipulación genética se cuenta con una gama completa de herramientas moleculares, lo que incrementa aún más su valor como biorreactor para la producción de PR de interés médico (Rivera-Solís *et al.*, 2011). Contiene un único gran cloroplasto que ocupa aproximadamente del 40-60% del volumen celular. El genoma del cloroplasto es una molécula circular de aproximadamente 200 Kb, cada cloroplasto contiene de 50 a 80 copias idénticas del genoma. En consecuencia, la transformación estable del cloroplasto requiere que todas las copias del genoma se conviertan a la forma recombinante. Los eventos de transformación pueden ser dirigidos a cualquier región en el genoma del cloroplasto que contenga un "sitio silencioso" para la integración del transgen. La selección de los cloroplastos transformados puede realizarse ya sea por la cotransformación con ADN que confiere resistencia a antibióticos o por fototrofia (Fischer *et al.*, 1996; Goldschmidt-Clermont 1991 y Boynton *et al.*, 1988).

Hasta la fecha, sólo pocas proteínas terapéuticas han sido expresadas en cloroplastos de *Chlamydomonas*. El primero de estos fue un anticuerpo anti-herpes de humano que contenía una región codificante de la cadena pesada ligada a una región variable de cadena ligera a través de un enlazador peptídico flexible. El gen que codifica para este anticuerpo de cadena única (HSV8-lsc) fue sintetizado en el cloroplasto y expresado utilizando los promotores *atpA* ó *rbcl* y 5'UTRs. La proteína HSV8-lsc se acumuló aproximadamente en un 0.5% de la proteína total soluble (PTS), y se encontró

completamente en la fase soluble sin acumulación aparente como agregados insolubles (Mayfield *et al.*, 2003).

También ha sido probado el uso potencial del cloroplasto de *C. reinhardtii* como una plataforma para la producción de vacunas. Un ejemplo de esto es un gen que contiene la región de codificación VP1 del virus de la fiebre aftosa (FMDV) fusionado a la secuencia codificante de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB). La proteína quimérica se detectó por Western blot y ELISA con rendimientos reportados hasta de un 3% de PTS (Sun *et al.*, 2003).

Otra proteína terapéutica potencial, es TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral humano) la cual también se ha expresado en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Yang *et al.*, 2006). La porción soluble en el C-terminal de TRAIL es suficiente para inducir una apoptosis selectiva en células cancerosas e infectadas por el virus. El análisis Western blot mostró que TRAIL soluble se expresó en el cloroplasto, y los niveles de expresión de la proteína fueron estimados en alrededor de 0.5% de PTS. No se reportaron datos de bioactividad para esta proteína. Finalmente, se ha reportado que la proteína humana 2-metalotioneína ha sido expresada en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Zhang *et al.*, 2006). Esta proteína tiene el potencial de reducir el daño del ADN causado por la irradiación UV. La expresión del cDNA humano fue dirigida por el promotor chlL y UTR y la expresión de la proteína en los plástidos se encontró que confería resistencia ante la irradiación UV a las células transformadas. La expresión de este conjunto de proteínas recombinantes, aunque pequeña, muestra el potencial de los cloroplastos de algas para la producción de proteínas terapéuticas humanas (Mayfield *et al.*, 2007).

#### **1.4.2.2. *Chlorella vulgaris***

Las especies del género *Chlorella* son microalgas eucariotas, unicelulares, inmóviles, de forma esférica o elipsoide, con diámetros que van de 2 a 15  $\mu\text{m}$ . Son



principalmente fotoautótrofas aunque son capaces de utilizar fuentes de carbono orgánico solo (azúcares, carbohidratos, acetato, glicerol) o junto con CO<sub>2</sub> y luz para un crecimiento heterotrófico o mixotrófico (Liu y Cheng, 2016).

Aunque la producción comercial de proteínas heterólogas en *Chlorella* actualmente es poco viable, existen varios estudios en los que se utilizó a esta microalga modificada genéticamente para expresar proteínas heterólogas con resultados muy prometedores. Hasta la fecha los rendimientos de proteínas heterólogas producidas por *Chlorella* varían de 200 ng/L a 11.42 mg/L, lo cual es relativamente bajo en comparación con otros hospedadores de expresión eucariotas, como plantas (0.1 µg/L a 247 mg/L), células de mamíferos (0.55 a 80 mg/L) y células de insecto (80 a 300 mg/L) (Yang *et al.*, 2016).

En cuanto a la expresión de proteínas terapéuticas en *C. vulgaris*, se ha reportado la producción de lactoferrina bovina, un péptido con propiedades antimicrobianas que se expresó de manera estable bajo el control del promotor CaMV35S mediante electroporación. La lactoferrina expresada de manera heteróloga mostró actividad antimicrobiana significativa contra *E. coli*, sin embargo, no se menciona el rendimiento de lactoferrina recombinante (Koo *et al.*, 2013). También se ha reportado la expresión de una defensina de conejo (péptido neutrófilo de conejo-1) en *C. ellipsoidea*. Chen *et al.* (2001) transformaron *C. ellipsoidea* por medio de electroporación y reportaron la expresión transitoria de la defensina. El gen de la defensina fue dirigido por el promotor de la ubiquitina y el gen *nptII* se usó como marcador de selección. Analizaron la defensina biológicamente activa mediante pruebas antimicrobianas *in vitro* contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y contra el hongo *Fusarium oxysporum*, obteniendo un efecto inhibitorio significativo contra los microorganismos evaluados (Chen *et al.*, 2001). Posteriormente, el mismo grupo de investigación informó haber obtenido con éxito líneas celulares estables de *C. ellipsoidea* que expresa la defensina bioactiva, obtuvieron un rendimiento de 11.42 mg/L de la defensina recombinante incluso después de 15 generaciones (Bai *et al.*, 2013), este valor es considerado como el mayor rendimiento de proteínas heterólogas en *Chlorella sp.*

## 1.5. *Moringa oleifera* Lam.

*Moringa oleifera* Lam., es la especie más estudiada y de mayor distribución de la familia monogénica Moringaceae (Ramachandran *et al.*, 1980). Es nativa del oeste del Himalaya, India, Pakistán, Asia Menor, África y Arabia (Mughal *et al.*, 1999), actualmente se encuentra distribuida en Filipinas, Camboya, Centro América, Norte y Sur América y las Islas Caribe (Morton, 1991).

Es un importante producto alimenticio ya que prácticamente todas las partes de la planta son consumidas. Las hojas, frutos, flores y vainas inmaduras de este árbol se utilizan como un alimento con alto valor nutritivo en muchos países, sobre todo en la India, Pakistán, Filipinas, Hawái y muchos lugares de África (Anwar y Bhangar, 2003; Anwar *et al.*, 2005).

*M. oleifera* Lam. es rica en ramnosa, un azúcar simple, glucosinatos e isotiocianatos. Sus raíces contienen moringina y moringinina, además de otros ingredientes, tales como: fitosterol, ceras, resinas, zeatina, quercetina, ácido cafeoilquínico, pterigospermina y kaempferol (Posmontier, 2011).

Se han atribuido una serie de propiedades farmacológicas a cada una de las partes de *M. oleifera* (Tabla 1). Casi todas las partes de esta planta: raíces, cortezas, goma, hoja, fruto (vainas), flores, semilla y aceite de semilla se han utilizado para tratar varias enfermedades en la medicina indígena del Sur de Asia (Siddhuraju y Becker, 2003).

De acuerdo a los requerimientos que presenta *M. oleifera* para su proliferación, este árbol tiene un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. De hecho, *M. oleifera* ya es parte de la horticultura tradicional mexicana desde hace tiempo, principalmente con fines ornamentales: la encontramos abundantemente en los pueblos de toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (al sur de La Paz). Los ejemplares de moringa son especialmente abundantes y frondosos en las llanuras calientes del sur del istmo de Tehuantepec. La planta también se

cultiva en los poblados de las depresiones tropicales secas del país, como la del Balsas y la depresión central de Chiapas. La planta se encuentra en los pueblos de la zona del Infiernillo y en las cercanías de Apatzingán, Mezcala, Iguala y Tequesquitengo. Gracias a su distribución cultivada, la moringa es una planta de zonas cálidas que nunca sufren heladas (Olson y Fahey, 2011).

**Tabla 1.** Propiedades farmacológicas de las diferentes partes de *M. oleifera* Lam.

Parte de la Planta	Propiedades farmacológicas	Referencias
Raíz	Antilitiásico, rubefaciente, vesicante, carminativo, para la fertilidad, antiinflamatorio, para estimular a pacientes en estado paralítico; también actúa como tónico cardiocirculatorio, como laxante, como método abortivo y se emplea para aliviar algunas afecciones: reumatismo, inflamaciones, dolores articulares, sacrolumbalgia y estreñimiento.	Ruckmani <i>et al.</i> , 1998
Hoja	Purgante, como cataplasma en las heridas, para minimizar los dolores de cabeza, la hemorroides, la fiebre, el dolor de garganta, bronquitis, las infecciones óticas y oculares, el escorbuto y el catarro; el jugo de las hojas controla los niveles de glucosa y reduce la inflamación glandular.	Morton, 1991
Corteza del tallo	Rubefaciente, vesicante, para curar enfermedades oculares y para el tratamiento de pacientes delirantes. Asimismo, previene el agrandamiento del bazo y la formación de glándulas tuberculosas en el cuello, destruye los tumores y sana las úlceras. El jugo de la corteza del tallo alivia los dolores de oídos, se pone en la cavidad dentaria como analgésico y tiene actividad antituberculosa.	Siddhuraju y Becker, 2003
Goma o resina	Se emplea para corregir las caries dentales, es astringente y rubefaciente; mezclada con el aceite de ajonjolí, alivia el dolor de cabeza, la fiebre, las molestias intestinales, la disentería y el asma. Muchas veces se utiliza como abortivo y para tratar a pacientes con sífilis y afecciones reumáticas.	Faizi <i>et al.</i> , 1998
Flor	Poseen alto valor medicinal como estimulante, afrodisíaco, abortivo, colagogo y antiinflamatorio. Se emplean para aliviar enfermedades musculares, histeria, tumores, agrandamiento del bazo, para bajar los valores del colesterol, los fosfolípidos, los triglicéridos y el índice aterogénico; también disminuye el perfil lipídico del hígado, del corazón y de la aorta en conejos hipercolesterolémicos y aumenta la excreción de colesterol fecal.	Siddhuraju y Becker, 2003; Mehta <i>et al.</i> , 2003
Semilla	El extracto de las semillas ejerce su efecto protector, disminuye los peróxidos lipídicos del hígado.	Faizi <i>et al.</i> , 1998

## 2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia de microorganismos patógenos a antimicrobianos es una de las amenazas más importantes para la salud humana. Un alto porcentaje de infecciones hospitalarias se deben a bacterias resistentes a antibióticos. Aunado a lo anterior, las grandes pérdidas monetarias causadas por el ataque de hongos fitopatógenos a cultivos económicamente importantes hacen evidente la necesidad de buscar nuevas opciones que permitan sustituir a los antibióticos y antifúngicos convencionales.

Una opción viable para la eliminación de microorganismos patógenos de áreas contaminadas es el uso de péptidos antimicrobianos ya sean de origen vegetal o de origen bacteriano (bacteriocinas). Respecto a los PAMs de origen vegetal se han reportado péptidos antibacterianos como el FLO y antifúngicos como el *Mo*-CBP<sub>3</sub> que se encuentran en pequeñas fracciones en las proteínas de las semillas de Moringa; mientras que en el género bacteriano *Enterococcus* se ha reportado a la bacteriocina E-760 como eficaz bactericida.

Por lo anterior es importante expresar y obtener péptidos antimicrobianos funcionales contra patógenos bacterianos y fúngicos mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante, con la que se pueden producir proteínas heterólogas que contengan los biopéptidos de interés en sistemas de expresión microbianos como bacterias y microalgas, lo que reduce significativamente los costos de producción y se obtiene un buen rendimiento.

En este trabajo se pretende obtener y analizar el perfil de expresión de los PAMs FLO y *Mo*-CBP<sub>3</sub> de *M. oleifera*, así como la bacteriocina E-760 de *Enterococcus spp.* utilizando diversas plataformas de expresión como lo son: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Escherichia coli*, además de analizar la funcionalidad de estos péptidos obtenidos por vía recombinante contra bacterias patógenas.

### 3. HIPÓTESIS

1. Los péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* Lam. y *Enterococcus sp.* producidos en las plataformas *Escherichia coli*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* serán bactericidas y/o fungicidas efectivos.
2. *E. coli*, *C. reinhardtii* y *C. vulgaris* serán eficientes y estables plataformas de expresión para la producción de los péptidos antimicrobianos de interés.

## 4. OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL.**

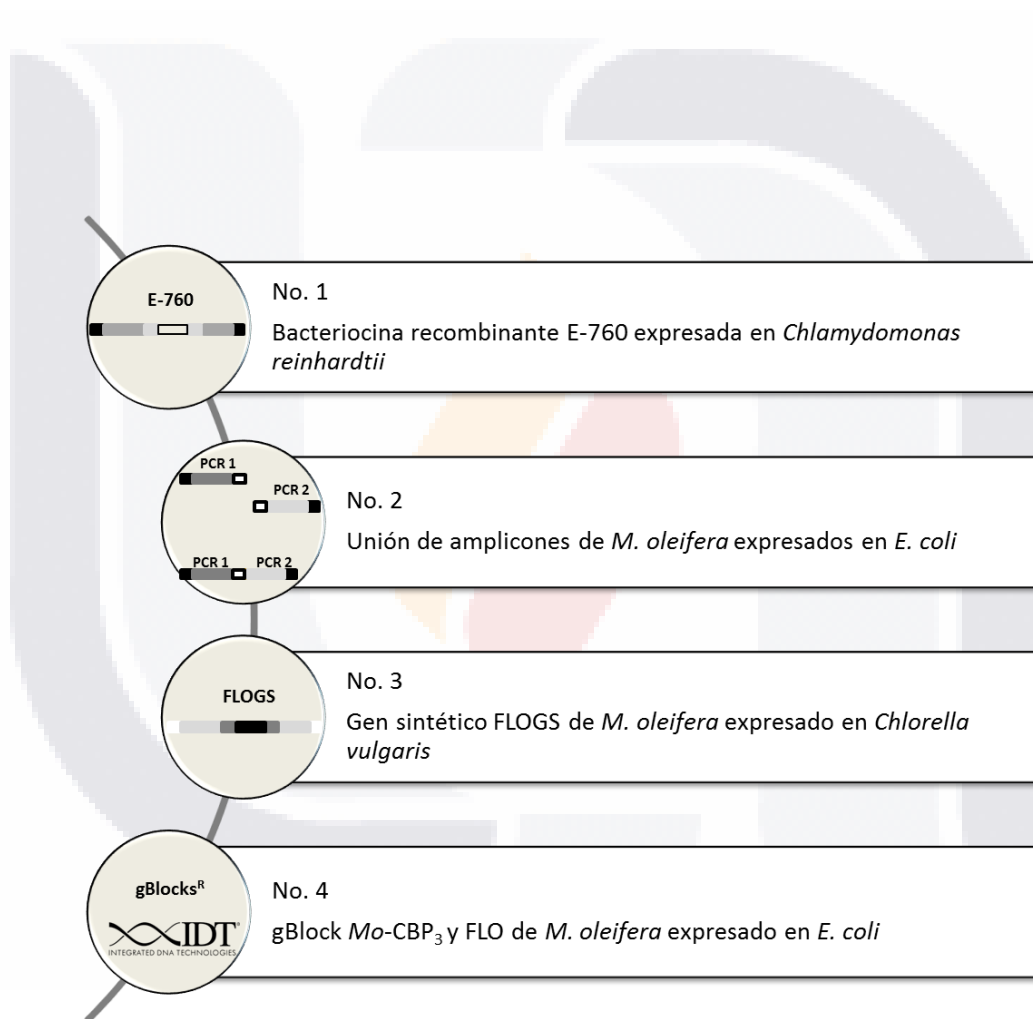
Producir y analizar la funcionalidad de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* y de *Enterococcus sp.*

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias que contengan péptidos antimicrobianos e identificarlos mediante PCR en *M. oleifera*.
- Realizar un estudio bioinformático de los productos amplificados de *M. oleifera*.
- Expresar las proteínas recombinantes en *C. reinhardtii* y/o *E. coli* y/o *C. vulgaris*.
- Verificar la funcionalidad de los péptidos antimicrobianos en pruebas de inhibición con cepas bacterianas y fúngicas.
- Analizar la funcionalidad del péptido antibacteriano E-760 de *Enterococcus sp.* obtenido por vía recombinante en *C. reinhardtii*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los péptidos antimicrobianos de *M. oleifera* y *Enterococcus* sp., se diseñaron 4 estrategias que involucraron diversas técnicas de biología molecular, así como vectores de expresión para *E. coli* (pET32a) y para las microalgas *C. reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* dirigidos a núcleo (pChlamy\_1) y cloroplasto (p464), respectivamente. La estrategia general se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Estrategias para la obtención de péptidos antimicrobianos en diferentes plataformas



## 5.1. Cepas de algas y bacterias, condiciones de cultivo.

Como plataformas de expresión se utilizaron la bacteria *Escherichia coli* cepa BL21 DE3Star y las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* cepa cc137 mt (+) obtenida del Chlamydomonas Resource Center ([www.chlamycollection.org](http://www.chlamycollection.org)) y *Chlorella vulgaris* donada por el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. El crecimiento de *E. coli* se realizó en medio Luria-Bertani (LB) en matraces de 500 mL a 37°C con agitación constante (200 rpm) mientras que las microalgas se crecieron en medio de cultivo Tris-Acetato-Fosfato (TAP) (Gorman y Levine, 1965) en matraces de 2 L a 25°C con agitación constante (200 rpm), con fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad) y una intensidad lumínica de 5,000 lux. Para las cepas transformantes se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento arriba mencionadas además de adicionar ampicilina (100 mg/L) para el caso de *E. coli* transformada con el vector pET, higromicina (5 mg/L) para *C. reinhardtii* transformada con el vector pChlamy\_1 y espectinomicina (100 mg/L) para *C. vulgaris* transformada con el vector p464.

Para la estrategia 1 se transformó a *C. reinhardtii* con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 portadora de la construcción del vector pChlamy\_1 + E760. Las bacterias utilizadas para las pruebas de inhibición fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae* y *Enterococcus faecium* (donadas por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México), *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (proporcionadas por el Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Aguascalientes, México). Todas las bacterias se crecieron en medio LB a 37°C con agitación constante (200 rpm) durante 24 h antes de realizar cualquier protocolo.

## 5.2. Diseño de las construcciones

### 5.2.1. Estrategia 1. Diseño del gen sintético codificante para la bacteriocina E-760 y construcción del plásmido.

Se partió de una construcción previamente generada en el trabajo de Pérez- Juárez y Soria-Guerra (2017), quienes diseñaron una quimera codificante para la Enterocina E-760 (Line *et al.*, 2008), la síntesis y optimización de codones para su expresión en núcleo de *C. reinhardtii* fue realizada por la compañía GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA). Al gen quimérico se le denominó como E-760S el cual contiene 243 pb; hacia el extremo 5' cuenta con el sitio de restricción *Xba*I seguido de una etiqueta de Histidinas (6 His), un sitio de corte para Trombina, la secuencia madura de la bacteriocina E-760, al extremo 3' el codón de paro (TAA), el sitio de unión a ribosomas (RBS) y el sitio de restricción *Nde*I (Figura 3).

El gen E-760S sintetizado estaba ligado en el vector pUC y fue liberado con las enzimas *Xba*I y *Nde*I; así mismo, se linealizó el vector pChlamy\_1 (Invitrogen, Waltham, MA USA) con las mismas enzimas. Tanto el fragmento de E-760S como el vector pChlamy\_1 fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI). Los fragmentos se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Fitchburg, WI). Con esta construcción (pChlamy1 / E-760S) (Figura 4) se transformaron por choque térmico células competentes de *Escherichia coli* TOP10 y se seleccionaron en medio LB adicionado con ampicilina 100 mg/L. Se extrajo ADN plasmídico por el método de Birboin-Dolly (Sambrook *et al.*, 1989) y se identificó una clona con la construcción deseada mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

```

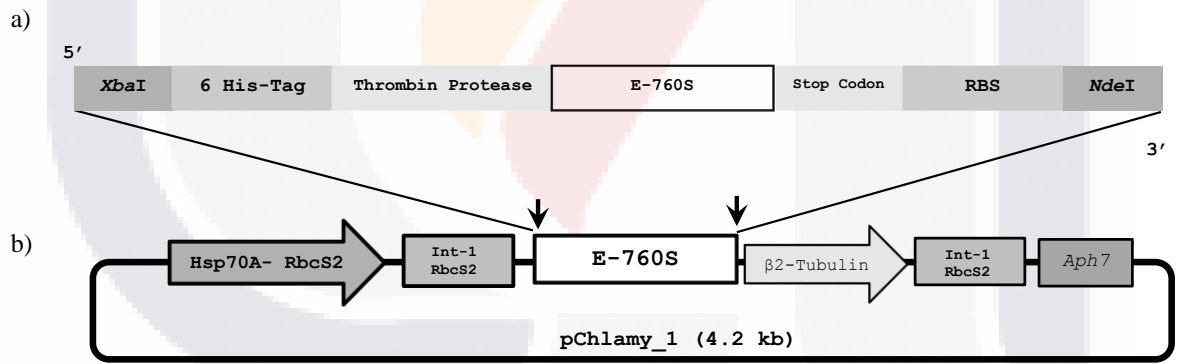
5'
XbaI  M  H H H H H H L V P R G S N R W Y C N S A A G G V G G A
tctagaccatggtatcatcatcatcatcatcatttagttcctcgtggttagtaatcggttggtattgtaattcagctgcagggtggtggtggtgct

A G C V L A G Y V G E A K E N I A G E V R K G W G M A G G F T H
gcaggttggtatttagctggttatgtaggtgaagctaaggaaaatattgcaggtgaagttcgttaaggggtgggtatggctggtggtttcacacat

N K A C K S F P G S G W A S G - RBS NdeI
aataaggcatgtaagtcattcccaggttctggttgggcttcagggttaaaaggagacagcatatgccatgg
                                     3'
    
```

**Figura 3.** Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de E-760S.

La secuencia E-760S se sometió a optimización de codones para su expresión en núcleo de *C. reinhardtii*. El gen quimérico esta flanqueado por los sitios de restricción *XbaI* y *NdeI* a los extremos 5' y 3' respectivamente. Resaltados en negritas se señala el codón de inicio (M), la secuencia madura de E-760 y el codón de paro (-), subrayado se señala la etiqueta de histidinas (6 His), subrayado discontinuo se señala el sitio de unión a ribosomas (RBS).



**Figura 4.** Construcción pChlamy1 / E-760S.

a) Esquema de E-760S. b) El vector de expresión pChlamy\_1 cuenta con los siguientes elementos. Hsp70A-Rbc S2 es un promotor quimérico/hibrido constitutivo conformado por la proteína del choque térmico 70A y la subunidad pequeña de la RuBisCO, Int-1 Rbc S2 es el primer intrón de la subunidad pequeña de la RuBisCO (rbcS2) necesaria para mantener la alta expresión del gen de interés,  $\beta$ 2-Tubulin, fuerte promotor nativo de *C. reinhardtii* que conduce la expresión del gen *Aph7*. *Aph7*, gen de la aminoglucósido fosfotransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* que confiere resistencia a higromicina.

### 5.2.2. Estrategia 2. Unión de amplicones de *M. oleifera*

A partir de la secuencia de *M. oleifera* se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de 2 fragmentos que contienen péptidos antimicrobianos de interés como son el péptido FLO (Suarez *et al.*, 2003) y el *Mo*-CBP<sub>3</sub> (Gifoni *et al.*, 2012). A los oligonucleótidos diseñados se les adicionó la secuencia correspondiente a sitios de restricción *Nco*I y *Hind*III para el caso del amplicón *Mo*-CBP<sub>3</sub> mientras que para FLO se añadieron los sitios *Hind*III y *Spe*I (Tabla 2) con la finalidad de realizar un empalme de ambos fragmentos por complementariedad de secuencias. Cada uno de los amplicones fueron clonados en el vector pGEM-T® Easy (Promega, Fitchburg, WI) obteniendo las construcciones *Mo*-CBP<sub>3</sub>/pGEM y FLO/pGEM. Para lograr el empalme de ambos amplicones primero se liberó el fragmento FLO por medio de los sitios de restricción *Hind*III (adicionado a los primers) y *Sac*II (sitio del vector pGEM-T® Easy), a su vez la construcción *Mo*-CBP<sub>3</sub>/pGEM fue linealizada con *Hind*III, ambos fragmentos fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI) para luego ser ligados mediante la secuencia del sitio *Hind*III por complementariedad de secuencias (Figura 5). Para verificar tanto el empalme como el marco de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) se extrajo el ADN plasmídico de las clonas putativas y fue secuenciado. Una vez corroborado el correcto empalme de ambos amplicones se liberó este fragmento para ser clonado al vector de expresión pET32 para *Escherichia coli*.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos diseñados para amplificación de *Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO.

Especie	Fuente proteína	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos	Referencia
<i>M. oleifera</i>	<i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> P86528.1	<i>Nco</i> I 5' <b>CCATGG</b> CAGCGCTTCATCCGACGACAG 3' 5' <b>AAGCTT</b> AGCTCATTGGCCGAGGTTG 3' <i>Hind</i> III	289 pb	RPAIQRCCQQLRNIQPRCR	Gifoni <i>et al.</i> , 2012
	FLO P24303.1	<i>Hind</i> III 5' <b>AAGCTT</b> TGCAGAAGCACCAACAATGG 3' 5' <b>ACTAGT</b> ACAAGCACCCATGATTTTGGTA3' <i>Spe</i> I	210 pb	QGPGRQPDFQRCGQQLRNI SPPQRCPSLRQAVQLTHQQ QGQVGPQQVRQMYRVASN IPST	Gassenschmidt <i>et al.</i> , 1995, Suarez <i>et al.</i> , 2003



### 5.2.3. Estrategia 3. Diseño del gen sintético codificante para el péptido antibacteriano FLO de *M. oleifera* y construcción del plásmido

Se diseñó un gen sintético codificante para el péptido antibacteriano FLO (Gassenschmidt *et al.*, 1995), la síntesis y optimización de codones para su expresión en el cloroplasto de *Chlorella vulgaris* fue realizada por la compañía GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA). Al gen quimérico se le denominó FLOGS el cual contiene 243 pb; hacia el extremo 5' cuenta con una etiqueta de Histidinas (6 His), un sitio de corte para Trombina, la secuencia del péptido FLO, al extremo 3' el codón de paro (TAA) y el sitio de unión a ribosomas (RBS), dicha secuencia está flanqueada por el sitio de restricción *NcoI* en ambos extremos (Figura 6).

El gen FLOGS sintetizado estaba ligado en el vector pUC y fue liberado con las enzimas *NcoI*, a su vez, el vector p464 obtenido del *Chlamydomonas* Stock Center (Duke University, Durham, NC, USA) se linealizó con la misma enzima. Tanto el fragmento de FLOGS como el vector p464 fueron purificados y ligados como se menciona en la sección 3.2.1., con esta ligación (FLOGS / p464) (Figura 7) se transformaron por choque térmico células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron en medio LB adicionado con ampicilina 100 mg/L. Se extrajo ADN plasmídico por el método de Birboin-Dolly (Sambrook *et al.*, 1989) y se identificó una clona con la construcción deseada mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

5'

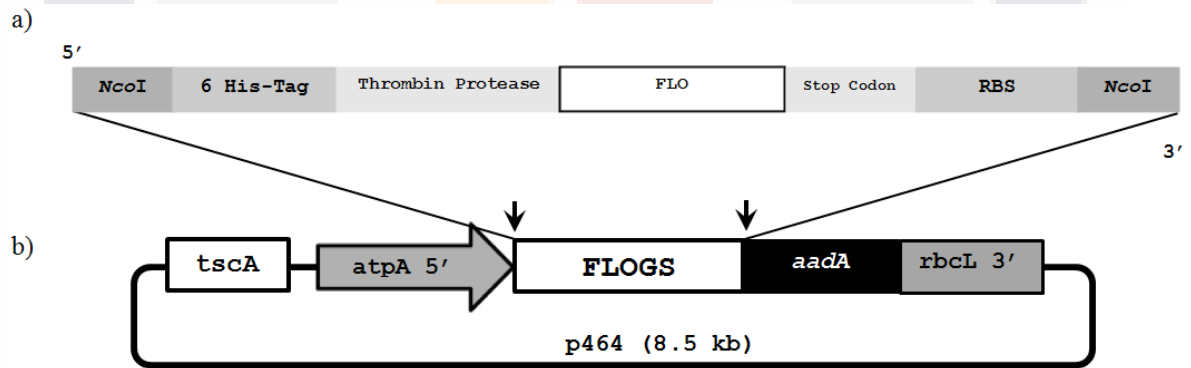
*NcoI* H H H H H H L V P R G S Q G P G R Q P D F Q R C  
 ccatggtacatcatcatcatcatttagttcctcgtggtagtcagggtccagggtcgtcaaccagatttccaacgttgt  
 ↑

G Q Q L R N I S P P Q R C P S L R Q A V Q L T H Q Q Q  
 ggtaacaattacgtaataatctctcctcaacggtgtccatcattacgtcaagctgttcaattaacacatcaacaaca

G Q V G P Q Q V R Q M Y R V A S N I P S T - RBS *NcoI*  
 ggtaagtaggtccacaacaagttcgtcaaatgtatcgtgtagcatcaaatattccatcaacataaaggaggacagccatgg  
 ↑ 3'

**Figura 6.** Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de FLOGS.

La secuencia de FLOGS se sometió a optimización de codones para su expresión en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. El gen quimérico esta flanqueado por el sitio de restricción *NcoI* en ambos extremos. Resaltados en negritas se señala el codón de inicio (M), subrayado se señala la etiqueta de histidinas (6 His), subrayado discontinuo se señala el sitio de unión a ribosomas (RBS).



**Figura 7.** Construcción FLOGS / p464.

a) Esquema de FLOGS. b) El vector de expresión p464 cuenta con los siguientes elementos. *tscA*, región del genoma del cloroplasto utilizado para recombinación homóloga entre el plásmido de inserción y el genoma de *C. vulgaris*; *atpA*, promotor constitutivo de la subunidad alfa de la ATP sintasa; *aadA*, gen de la aminoglucósido adenintransferasa que confiere resistencia a la estreptomomicina/espectinomomicina; *rbcL*, corresponde al terminador de la RuBisCO subunidad mayor.



#### 5.2.4. Estrategia 4. Secuencia sintética denominada gBlock codificante para ambos péptidos antimicrobianos de *M. oleifera*

Esta es una secuencia sintética diseñada para codificar solo la secuencia madura de los péptidos de interés (*Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO), la síntesis y optimización de codones para su expresión en *E. coli* fue realizada por la compañía Integrated DNA Technologies (San Diego, CA). El gBlock contiene 269 pb, hacia el extremo 5' cuenta con el sitio de restricción *Nco*I seguido del codón de inicio (ATG), luego las secuencias maduras de los péptidos *Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO (separadas por un codón de inicio) y hacia el extremo 3' se colocó un codón de paro (TAA) y el sitio de restricción *Hind*III (Figura 8).

Así mismo se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gBlock (Tabla 3) y clonarlo al vector pGEM-T® Easy. Tanto el vector de expresión pET32 como el gBlock fueron digeridos con la enzima *Eco*RI y posteriormente purificados. Los fragmentos se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Fitchburg, WI). Con esta construcción (pET32 / gBlock) se transformaron por choque térmico células competentes de *Escherichia coli* DH5α y se seleccionaron en medio LB adicionado con ampicilina 100 mg/L. Se extrajo ADN plasmídico por el método de Birboin-Dolly (Sambrook *et al.*, 1989) y se identificaron algunas clonas con la construcción deseada mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

```

5'
NcoI  M C P A I Q R C C Q Q L R N I Q P P C R C C Q
cca tggta atggtgccggccatacaacgggtgctgtcaacagttgagaaatatacagcccccggtgccgggtgttgcag
      ↑
M Q G P G R Q P D F Q R C G Q Q L R N I S P P Q R
atgcaaggaccgggaagacagccggattttcagcgttgtgggcagcagttgcggaatataatcgccgccccaaaga
      ↑
C P S L R Q A V Q L T H Q Q Q G Q V G P Q Q V R Q
tgccctccttacgtcaggcagtcacaattaactcatcaacagcaggggcaagttggacctcagcaagtgagacaa

M Y R V A S N I P S T - HindIII
atgtaccgtgtggcatcaaacataccctcgacgtaaagctt
                                                    3'
    
```

**Figura 8.** Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de gBlock.

La secuencia del gBlock está flanqueada por los sitios de restricción NcoI y HindIII a los extremos 5' y 3' respectivamente. Resaltados en negritas se señala el codón de inicio (M), la secuencia del péptido FLO y, subrayado y en itálicas se señala el codón de paro (-).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos diseñados para amplificación del gBlock.

Secuencia sintética	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos
gBlock	5' ATGTGTCCGGCCATACAACGGT 3' 5' TTACGTCGAGGGTATGTTTGATGC 3'	255 pb	RPAIQRCCQQLRNIQPRCR QGPRQPDFQRCGQQLRNISPPQRCPSLRQAVQL THQQQGQVGPQQVQRMYRVASNIPST

### **5.3. Análisis *in silico* de las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas**

Las secuencias codificantes para las proteínas sintéticas se analizaron bioinformáticamente para caracterizarlas. La traducción virtual se realizó en la plataforma ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), la determinación de los parámetros fisicoquímicos como punto isoelectrico (pI) y Gran Promedio de Índice de Hidropaticidad GRAVY se realizó en la plataforma ProtParam [<http://web.expasy.org/protparam/>] (Gasteiger *et al.*, 2005). Los gráficos de hidropatía de aminoácidos se realizaron con la herramienta ProtScale [<http://web.expasy.org/protscale/>] (Gasteiger *et al.*, 2005), en base a la escala de Kyte y Doolittle (1982). Para la búsqueda de secuencias homologas en aminoácidos se utilizó el programa Blast de la base de datos del Uniprot (The Uniprot Consortium, 2017). Los motivos conservados fueron analizados con la plataforma MEME [Motif-based sequence analysis tools; <http://meme.nbcr.net/meme/>] (Bailey *et al.*, 2015). El alineamiento múltiple de las secuencias homólogas se realizó en el programa Clustal Omega [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>] (Sievers *et al.*, 2011). Para el modelado tridimensional de la estructura de E-760S se utilizó el servidor PEP-FOLD 3.5 [<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>] (Lamiable *et al.*, 2016), mientras que para edición del modelado de utilizo el programa USCF Chimera versión 1.10.1 (Pettersen *et al.*, 2004).

### **5.4. Transformación de microalgas y bacterias con las construcciones de interés**

#### **5.4.1. Transformación de *C. reinhardtii* por vía nuclear**

Pérez –Juárez y Soria–Guerra (2017), realizaron la transformación de *C. reinhardtii* por vía nuclear, para lo cual transformaron *A. tumefaciens* GV3101 con la construcción pChlamy1 / E-760S por electroporación (BioRad, Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones: 2400 V, 200  $\Omega$ , 25 $\mu$ F. Las células transformadas se inocularon en medio

sólido LB adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37°C por 19 h. Para la transformación genética de *C. reinhardtii* cc137 mt (+) se siguió el protocolo descrito por Kumar *et al.*, (2004). Primeramente se creció la transformante de *A. tumefaciens* en medio LB con ampicilina (100 mg/L) hasta alcanzar una OD de 0.6, se agregó acetosiringona a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . Un pre inóculo de la cepa de *C. reinhardtii* se creció en medio TAP líquido durante 5-7 días, la biomasa se concentró por centrifugación a 2400 rpm y se inoculó medio TAP sólido, por último se agregó el cultivo de *A. tumefaciens* con acetosiringona. El co-cultivo se incubó durante 2 días a 25°C en oscuridad total. Al tercer día se hicieron lavados con medio TAP líquido y cefotaxima (500 mg/L) para eliminar a *A. tumefaciens*. Posteriormente, se obtuvo la biomasa y se sembró en medio TAP sólido con higromicina a 5 mg/L.

#### **5.4.2. Transformación de *C. vulgaris* vía cloroplasto mediante biobalística**

##### **5.4.2.1. Preparación de suspensión de partículas de oro**

Se pesaron 50 mg de partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro en un tubo Eppendorf, se agregó 1 mL de etanol (grado biología molecular) al 100% y se agitó vigorosamente por 3 min, se sedimentaron las partículas por centrifugación a 14,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 70% y se agitó vigorosamente por 2 min, el tubo se incubó por 15 min a temperatura ambiente y cada 5 min se agitó, al finalizar el tiempo, se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante, después se agregó 1 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente por 1 min, las partículas se dejaron asentar a temperatura ambiente y luego se centrifugaron 2 min a 14,000 rpm para luego descartar el sobrenadante, el lavado se repitió 2 veces, se agregó glicerol al 50% (v/v) para dejar las partículas a una concentración de 60 mg/mL. Las partículas preparadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **5.4.2.2. Preparación del material para bombardeo**

Las mallas de retención, los discos de ruptura, discos de acarreo y los anillos se sumergieron en isopropanol al 100% durante 10 min, después se dejaron secar, todo esto se realizó en campana de flujo laminar. Para el recubrimiento de las partículas con el DNA de interés, se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de partículas de oro y se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de DNA plasmídico a una concentración 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se agitó vigorosamente por 5 min, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  estéril (2 M) y 10  $\mu\text{l}$  de espermidina (0.1 M) en agitación continua. Luego se agitó nuevamente la mezcla por 20 min a 4°C, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto a temperatura ambiente, se agitaron por 5 s y se centrifugaron por 30 s a 800 g. Se removió el sobrenadante y se repitió este paso 4 veces para finalmente resuspender el pellet en 30  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%, las partículas se colocaron en hielo hasta su uso.

#### **5.4.2.3. Bombardeo con partículas de oro**

Para la transformación de cloroplastos de *C. vulgaris* se partió de un cultivo líquido en fase logarítmica, las células se concentraron por centrifugación a 4,000 rpm por 5 min, se resuspendieron en medio TAP. Aproximadamente  $2.4 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$  fueron esparcidas en medio TAP sólido. Para la transformación de cloroplastos se utilizaron partículas de oro recubiertas con la construcción p464 / FLOGS. El equipo de biobalística utilizado fue el sistema PDS-1000/He (Bio-Rad, Hércules, CA.) con los siguientes parámetros de bombardeo: distancia 9 cm, vacío de 15 pulgadas de Hg, Helio presurizado a 1,100 psi y partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro recubiertas con DNA plasmídico a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Las líneas transgénicas fueron seleccionadas mediante resiembras sucesivas cada dos semanas en medio TAP adicionado con espectinomicina (150 mg/L).

#### **5.4.3. Transformación de *E. coli* BL21 Star**

Previo a la transformación se prepararon células quimio-competentes para lo cual, a partir de un stock de glicerol de *E. coli* BL21 DE3 se inocularon 5 mL de medio LB, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{MnCl}_2$  (1 M) y 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  (1 M), se incubaron

por 19 h a 37 °C con agitación a 180 rpm. Luego se adicionaron 2 mL del cultivo bacteriano a 95 mL de medio SOB además de 1 mL de una solución de 1M MnCl<sub>2</sub>, 1M MgSO<sub>4</sub> y 2 mL de Glucosa 1 M (recién preparada), se incubaron por 1-2 h hasta alcanzar una OD<sub>595</sub> de 0.4 a 0.45 para luego incubarse en hielo por 10 min y después centrifugarse a 2,700 g por 12 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 32 mL de buffer TF1 frío, se incubaron 15 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 2,700 g por 12 min a 4 °C, nuevamente se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 8 mL de buffer TF2 (frio), se distribuyó en alícuotas de 100 µl las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron -80 °C.

Para la transformación se utilizaron alícuotas de las células competentes preparadas anteriormente y se descongelaron en hielo (aproximadamente 5 min), se mezcló de 1-3 µl de las construcciones de interés (*Mo*-CBP<sub>3</sub>/pET32, FLO/pET32, *Mo*-CBP<sub>3</sub>-FLO/pET32 y gBLOCK/pET32) en 50 a 100 µl de células competentes, se mezcló suavemente y se incubó el vial en hielo por 20-30 min. El choque térmico se realizó a 42 °C por 45 s y después en hielo por 2 min, se añadieron 500 µl de medio LB o SOC (sin antibiótico) y se incubaron a 37 °C por 60 min con agitación vigorosa (250 rpm). Se inocularon las células transformadas en una placa de LB con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

## **5.5. Selección de cepas recombinantes mediante PCR**

### **5.5.1. *C. reinhardtii* transformada con E-760**

Pérez –Juárez y Soria–Guerra (2017), realizaron las pruebas de selección en placa y por PCR de las clonas recombinantes de *C. reinhardtii*. Para lo cual, las transformantes putativas de *C. reinhardtii* las separaron tras varias rondas de selección con higromicina (3 rondas a una concentración de 5 mg/L, una selección a 10 mg/L y una última ronda a 20 mg/L de higromicina). Para confirmar la presencia del transgen por análisis de PCR se realizaron extracciones de ADN genómico de acuerdo a lo descrito por Newman *et al.*,

(1990). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos de la región codificante E760-F: 5'-GGTGCAGCAGGTTGTGTTTT-3' y E760-R: 5'-CCCAACCACTACCAGGGAAT-3'. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 62°C por 30 s y 72°C por 30s, finalmente una etapa de extensión final a 72°C por 3 min. Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa a 2%, teñidos con EtBr (0.5 µg/mL) y visualizados mediante luz-UV a 260 nm.

### **5.5.2. *C. vulgaris* transformada con FLOGS**

Las transformantes putativas de *C. vulgaris* fueron separadas tras varias rondas de selección con espectinomicina (3 rondas a una concentración de 100 mg/ L y dos rondas de 150 mg/L). Se realizaron extracciones de ADN genómico de acuerdo a lo descrito por Shin *et al.*, (2017). Se utilizaron los oligonucleótidos para la región codificante de FLOGS (F-5'-TCATTTAGTTCCTCGTGGTAGTCA-3' y R-5'-ATGGCTGTCCTCCTTATGTTG-3').

Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 20s, 58 °C por 20 s y 72°C por 30 s, finalmente una etapa de extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa al 1%, teñidos con EtBr (0.5 µg/mL) y visualizados mediante luz-UV a 260 nm.

### **5.5.3. *E. coli* transformada con gBlock (*Mo*-CBP<sub>3</sub> + FLO)**

Como primer paso se extrajo ADN plasmídico de las células transformadas por medio del método de Birboin-Dolly (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizaron los oligonucleótidos para la región codificante del gBlock (F-5'ATGTGTCCGGCCATACAACGGT-3' y R-5' TTACGTCGAGGGTATGTTTGATGC-3'). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30s, 58 °C por 30 s y 72°C por 30 s, finalmente una etapa de extensión final a 72 °C por 2 min. Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa al 1%, teñidos con EtBr (0.5 µg/mL) y visualizados mediante luz-UV a 260 nm.



## **5.6. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes de interés**

### **5.6.1. Inducción de la expresión de la bacteriocina E-760 en *C. reinhardtii***

La cepa transgénica de *C. reinhardtii* se inoculó en dos matraces de 1 L de medio TAP líquido a 25°C con agitación constante (200 rpm) hasta un crecimiento logarítmico, posteriormente se realizó una inducción a 35°C por 10 min y otra a 40°C por 30 min. Después de la inducción el cultivo se recuperó a temperatura ambiente por 2 h y se realizó la extracción de Proteínas Totales Solubles (PTS).

### **5.6.2. Inducción de la expresión de proteínas quiméricas en *E. coli***

Cepas transgénicas de *E. coli* con cada construcción (*Mo*-CBP<sub>3</sub>/pET32, FLO/pET32, *Mo*-CBP<sub>3</sub>-FLO/pET32 y gBLOCK/pET32) se cultivaron en 100 mL de medio LB líquido adicionado con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.7, se dividió el cultivo en 2 matraces con 50 mL de cultivo y a uno de ellos se le añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido o IPTG a una concentración final de 0.1, 0.5 y 1 mM, el otro matraz fungió como el control no inducido, ambos cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C. Se colectaron muestras a las 2, 4, 6 y 12 horas de inducción de ambos cultivos (Inducido y no inducido) para optimizar las mejores condiciones de expresión de las proteínas recombinantes.

## **5.7. Extracción y cuantificación de Proteína Total Soluble (PTS)**

### **5.7.1. Extracción de PTS a partir de microalgas**

Cultivos líquidos de las cepas transgénicas de *C. reinhardtii*, *C. vulgaris* y de las cepas silvestres se crecieron hasta una fase logarítmica tardía, la biomasa se concentró por centrifugación a 10,000 rpm por 5 min y se resuspendió en buffer de extracción (50mM Tris pH8, 40 mM NaCl y 0.1% Tween 20). Posteriormente se realizó una lisis celular por sonicación (Sonics Vibra-Cell™ Processors VCX 130 PB) a una amplitud del 80% durante 20 ciclos con pulsos de 10s de lisis y 5s de descanso, todo el proceso se realizó en

frio. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 13,000 rpm por 10 min. Los extractos crudos se utilizaron para cuantificar el contenido de PTS de cada cultivo mediante ensayo de Bradford (Bradford 1976) y posteriormente evaluados por SDS-PAGE al 15% (w/v) utilizando el método de Laemmli (Laemmli, 1970).

#### **5.7.2. Extracción de PTS a partir de *E. coli***

Cultivos líquidos de las cepas transgénicas de *E. coli* tanto inducidas y no inducidas fueron lisados por medio de sonicación. La biomasa celular se concentró por centrifugación a 10,000 rpm por 5 min para después ser re-suspendida en un volumen de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT), se incubó la suspensión celular en hielo por 10 min y se agregaron 10 µl de PMSF (100 mM) por cada mililitro de suspensión celular. Posteriormente se realizó la lisis mediante sonicación (Sonic Vibra-Cell™ Processors VCX 130 PB) a 40% de amplitud durante 10 ciclos con pulsos de 10 s de lisis y 10 s de descanso, todo el proceso de lisis se realizó en frío evitando la formación de espuma. El lisado se centrifugó a 14,000 g por 10 min para después recuperar la fracción soluble y cuantificar el contenido de PTS por el método de Bradford y posteriormente ser evaluados por SDS-PAGE al 15%.

#### **5.8. Purificación de la proteína recombinante E-760S**

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC) utilizando agarosa Ni-NTA (Invitrogen, Waltham, MA USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cepa transgénica de *C. reinhardtii* se creció hasta una fase logarítmica tardía en un matraz de 1 L, se concentró la biomasa celular como se mencionó anteriormente y se resuspendió en buffer de carga (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 ajustado con NaOH), se realizó una lisis por sonicación, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15,000 g por 20 min a 4°C. El extracto crudo final se agregó a una suspensión de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA pre-equilibrada con buffer de carga, la afinidad se realizó por 12 h a 4°C con agitación suave. Luego la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

resina fue empacada en una columna y se realizaron 10 lavados con buffer de carga para retirar proteínas no deseadas monitoreando el nivel de proteína eluída mediante espectrofotometría a 280 nm. La elución de la proteína recombinante se realizó mediante 10 lavados a la resina con buffer de elución (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM Imidazol, pH 8.0) monitoreando la proteína eluída mediante espectrofotometría.

### **5.9. Cuantificación de las proteína quiméricas E-760S y FLOGS mediante ensayo ELISA**

Para la cuantificación por ensayo ELISA se recubrió una placa de micro valoración con PTS (90 µg por pocillo) tanto de la cepa transgénica como de la silvestre y se incubó 12 h a 4 °C, junto con una curva estándar realizada a partir de cantidades conocidas de la proteína E-760 purificada a partir de *C. reinhardtii*. Los pocillos se lavaron con Buffer salino de fosfatos + Tween (PBST, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3mM KCl, 0.05% Tween® 20, pH 7.4), se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente con leche al 5% disuelta en PBS, se lavó la placa con PBST y se incubaron por 1 h a 37°C con un anticuerpo primario dirigido a la etiqueta de Histidinas (His). Después de lavar con PBST, las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La reacción de actividad de la peroxidasa se desarrolló con el substrato ABTS (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). El contenido de E-760S se cuantificó mediante la determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas (GloMax®-Multi+ Detection System. Promega). La cantidad de la proteína E-760 se expresó como porcentaje de PTS. La significancia estadística de las diferencias (P <0.05) entre las cepas transgénicas no inducidas, inducidas y de tipo salvaje de *C. reinhardtii* y *C. vulgaris* se determinó mediante un análisis de varianza de una vía.

## 5.10. Evaluación de la actividad antibacteriana

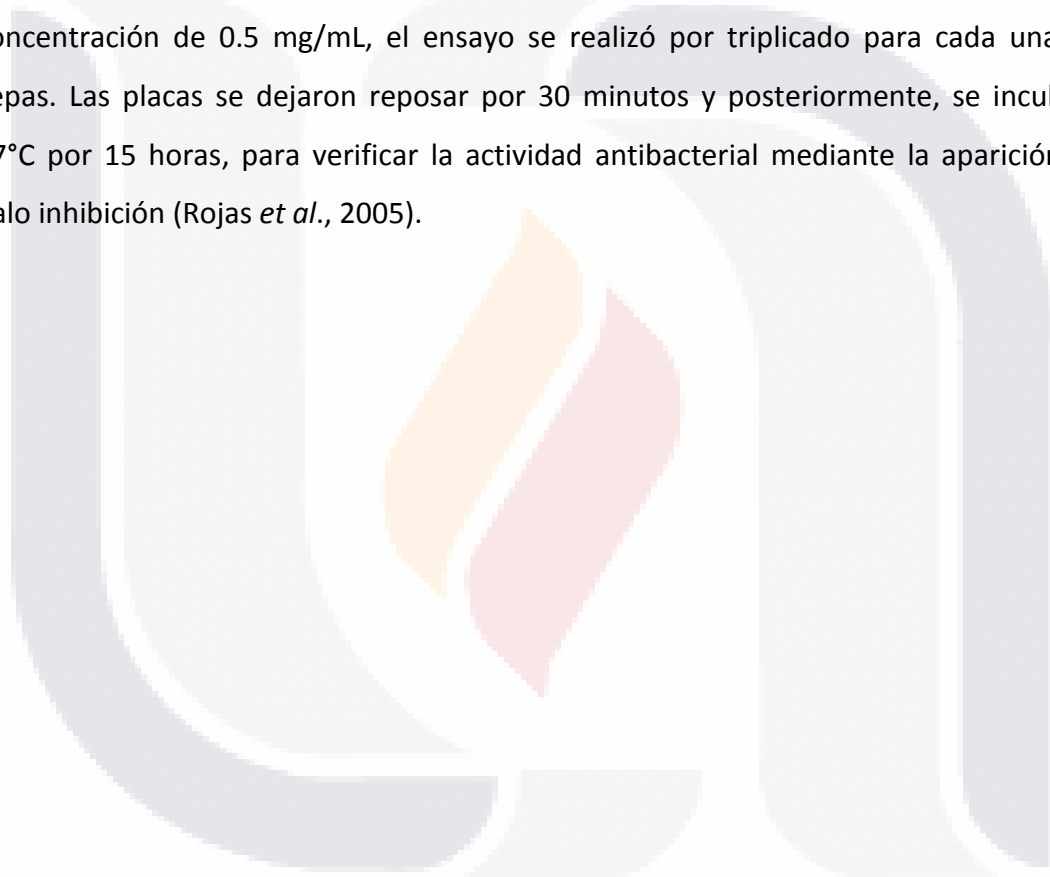
### 5.10.1. E-760S

La actividad antibacteriana de E-760S fue analizada frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae* y *Enterococcus faecium*, todos pertenecientes a aislamientos clínicos. De cultivos axénicos de cada cepa se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de medio LB líquido por 24 h a 37°C con agitación constante (200 rpm). Un volumen de 1.5 mL del cultivo se centrifugó a 12,000 rpm/5 min, el sobrenadante fue removido y el pellet se resuspendió en 1 mL de Buffer de fosfato de potasio estéril (0.05 M pH 7). La suspensión microbiana se ajustó hasta obtener un título de  $10^6$  UFC· mL (Unidades Formadoras de Colonia por mililitro). Una vez obtenida la carga bacteriana se adicionó la cantidad necesaria de PTS hasta alcanzar las concentraciones de 560 y 1,120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se llevó a un volumen final de 1 mL adicionando Buffer de fosfatos. Como controles se utilizaron suspensiones bacterianas eluidas en PTS de *C. reinhardtii* sin transformar, en buffer de fosfatos y adicionando ampicilina (0.3 mg/mL), como control positivo, bajo las mismas condiciones de crecimiento. La inhibición de los microorganismos se evaluó a 0, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos. Después de cada periodo de exposición se tomaron alícuotas de la suspensión y se inocularon en medio LB sólido por 19 h a 37°C, se contabilizó el número de CFU/mL. La inactivación log fue calculada como  $\log_{10}(N/N_0)$ , donde  $N_0$  representa las CFU/mL iniciales y N las CFU/mL sobrevivientes al tratamiento (Garcidueñas -Piña *et al.*, 2016). Los experimentos se realizaron por triplicado y se mantuvieron en condiciones estériles.

### 5.10.2. FLOGS

La actividad antibacteriana de FLOGS fue analizada cualitativamente frente a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en agar por medio de pocillos. De cultivos axénicos de cada cepa se tomó una colonia y se inoculó en 2 mL de medio LB líquido por 24 h a 37°C con agitación constante (200 rpm). Se ajustó la

absorbancia a 0.1, que corresponde a 0.5 en la escala Mc Farland, con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de las bacterias a una longitud de onda de 540 nm. Luego, placas de medio LB fueron inoculadas por estría con ayuda de un hisopo estéril por toda la caja. Posteriormente, se hicieron los pozos sobre la superficie del agar con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro. En cada pozo se vertió el volumen necesario para obtener una concentración de 50 µg de PTS de la cepa silvestre, 50, 100 y 150 µg de PTS de la cepa transgénica y como control positivo se utilizó ampicilina a una concentración de 0.5 mg/mL, el ensayo se realizó por triplicado para cada una de las cepas. Las placas se dejaron reposar por 30 minutos y posteriormente, se incubaron a 37°C por 15 horas, para verificar la actividad antibacterial mediante la aparición de un halo inhibición (Rojas *et al.*, 2005).



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estrategia 1. Gen quimérico codificante para la bacteriocina E-760

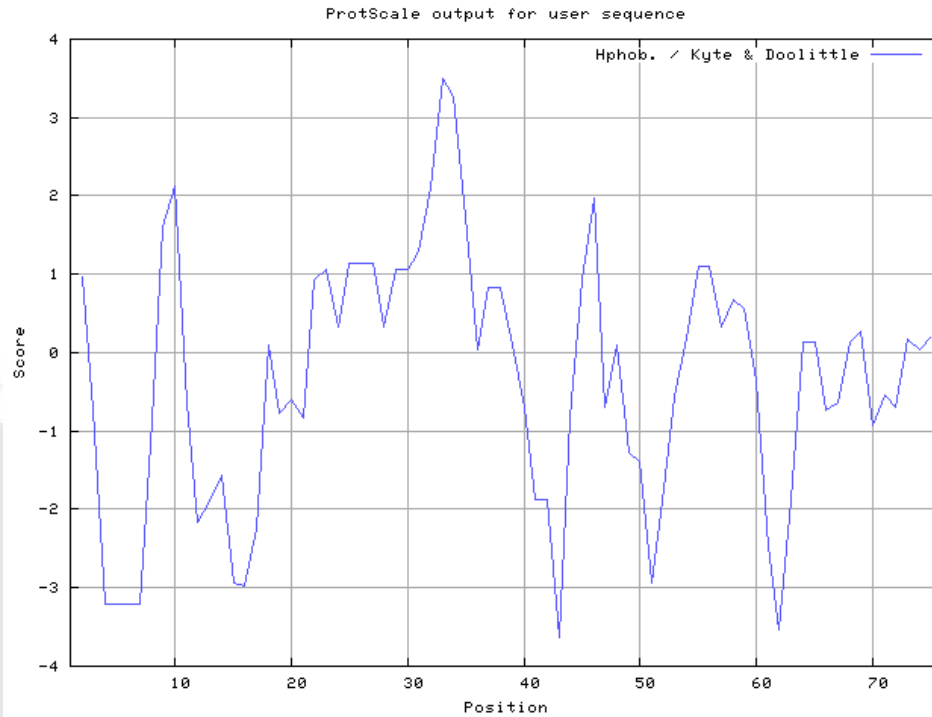
#### 6.1.1. Análisis *in silico* del gen sintético E-760S .

La traducción virtual de la quimera E-760S muestra que el gen sintético está en el Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame) correcto, ya que la síntesis proteica comienza con el aminoácido Metionina (M) seguido de la etiqueta de Histidinas (6 His), un sitio de corte para Trombina y la secuencia de la bacteriocina E-760 (Figura 3).

El análisis de parámetros físico químicos del péptido putativo de E-760 mostró que está conformado por un 40.8% de residuos hidrofílicos (GSTCYNQ), 36.7% por residuos hidrofóbicos (AVLIPMFW), 18.4% por residuos básicos (KRH) y el 3.9% por residuos ácidos (DE), además de que presenta un peso hipotético de 7.8 kDa, un punto isoeléctrico (pI) de 9.3, una carga neta de 4.5 a pH 7 y un GRAVY de -0.308 lo que indica que la proteína es ligeramente hidrofílica (Figura 9).

En la búsqueda de secuencias homólogas de E-760S en la base de datos de la NCBI, se encontró que tiene una alta similitud con la secuencia en aminoácidos de la bacteriocina Amylovorin-L471 (P80696) producida por *Lactobacillus amylovorus* y de una proteína no caracterizada (PNC) (A0A0R1GLB9) producida por *Lactobacillus crispatus* con actividad antibacteriana.

El alineamiento de E-760, Amylovorin-L471 y PNC mostró la presencia de 2 motivos conservados, el motivo NRW que en las tres secuencias se encuentra hacia el extremo N-terminal y el motivo GGVGGAAVCGLAGYV que esta hacia el extremo N-terminal de E-760 y para Amylovorin-L471 y la proteína no caracterizada se identificó hacia el extremo C-terminal. E-760 carece de los aminoácidos intermedios entre ambos motivos a diferencia de las otras secuencias analizadas (Figura 10). El modelo tridimensional putativo de E-760 se ilustra en la Figura 11.



**Figura 9.** Hidropaticidad de aminoácidos de E-760S

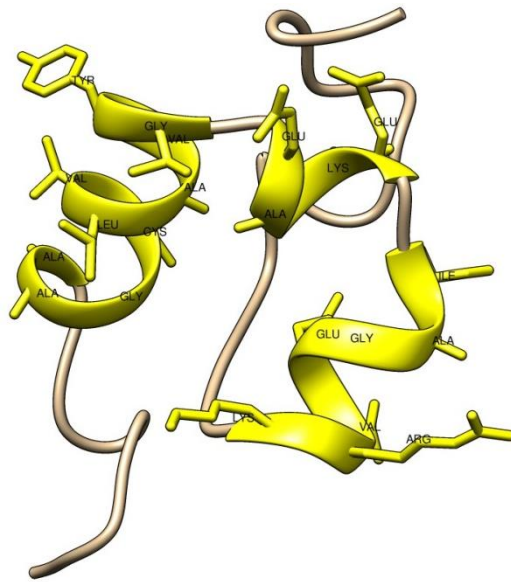
Los datos graficados se obtuvieron en base a la escala de Kyte y Doolittle (1982) donde entre menor es el valor más hidrofílico es el aminoácido.



**Figura 10.** Alineamiento de E-760, Am y UP

Enmarcados en recuadros negros se encuentran los motivos conservados. Sombreados en negro se enmarcan los motivos GxxxG y SxxxS presentes en E-760. Enmarcados en recuadros de línea punteada se encuentra la secuencia faltante en E-760. E-760= Enterocina E-760 (*Enterococcus* sp.); amyL= Amylovorin-L471 (*Lactobacillus amylovorus*); UP= Uncharacterized protein (*Lactobacillus crispatus*).



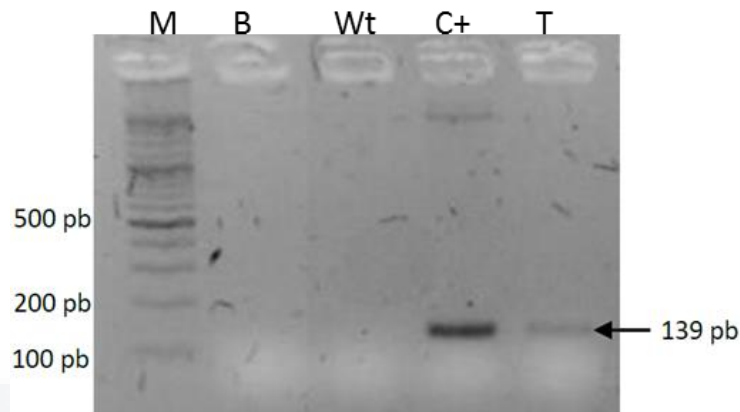


**Figura 11.** Estructura hipotética de la bacteriocina E-760

Según el modelo tridimensional arrojado por el servidor PEP-FOLD 3.5 contiene 3  $\alpha$ -hélice.

### 6.1.2. Selección de *C. reinhardtii* núcleo transformantes y análisis por PCR

La transformación mediante *A. tumefaciens* resultó exitosa al obtener 20 presuntas transformantes, sin embargo, por problemas de contaminación sólo una clona se utilizó en posteriores análisis. De la clona como presunta transformante se extrajo ADN para detectar la presencia del transgen mediante PCR. El tamaño del fragmento esperado de la transformante y del control positivo fue de 139 pb y para el control negativo (*C. reinhardtii* sin transformar) no hubo amplificación (Figura 12), lo que indica la presencia del transgen en la clona analizada y confirmada por su crecimiento en las 5 rondas en medio de selección.

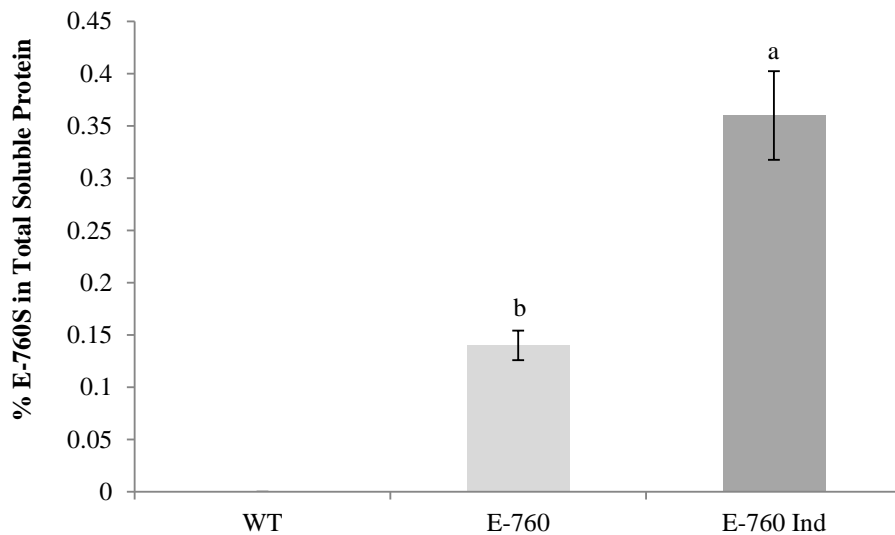


**Figura 12.** Análisis de PCR de transformantes de *C. reinhardtii* con primers específicos para el gen E-760S.

M: marcador de peso molecular de 100 pb; B: Control negativo de la reacción (Sin ADN); Wt: cepa silvestre de *C. reinhardtii*; C+: Control positivo, pUC18 / E-760S; T: Transformante de *C. reinhardtii* con la construcción pChlamy1 / E-760S (Pérez – Juárez y Soria–Guerra, 2017)

### 6.1.3. Cuantificación por ELISA de la proteína expresada.

El nivel de expresión del gen E-760S en la transformante de *C. reinhardtii* se cuantificó por ensayo de ELISA y se comparó con la cepa sin transformar, utilizando como estándar a la proteína E-760 purificada a partir de *C. reinhardtii*. La cantidad de proteína E-760 se expresó como porcentaje de PTS, con 0.36% para el cultivo de *C. reinhardtii* inducido (CI) a 35°C mientras que para el cultivo no inducido (CNI) el porcentaje fue de 0.14% (Figura 13). Cabe mencionar que el valor de E-760 para *C. reinhardtii* inducida a 40°C fueron prácticamente nulos (resultados no mostrados) lo cual podría deberse a la muerte celular, por lo que no se evaluó este tratamiento en las pruebas de actividad antibacteriana.



**Figura 13.** Niveles de acumulación de la proteína recombinante E-760 en la línea transgénica evaluada

La cuantificación de la proteína recombinante por ensayo de ELISA se determinó en una concentración conocida de PTS de *C. reinhardtii* transformada (90 µg/pocillo) y estandarizada contra una curva lineal de una cantidad conocida del estándar de la proteína E-760 purificada de *C. reinhardtii*. La cantidad de proteína fue expresada como el porcentaje de PTS. La absorbancia de las PTS de la cepa silvestre (WT) utilizada como control fue casi igual a la del fondo de los pocillos de la placa. El ensayo se realizó con un anticuerpo dirigido a la etiqueta de histidinas. Los valores son promedios de dos replicas con desviaciones estándar. WT, *C. reinhardtii* sin transformar; E-760, *C. reinhardtii* transformada con E-760 no inducida; E-760SInd., *C. reinhardtii* transformada con E-760S Inducida a 35°C · 10 min. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (P < 0.05).

#### 6.1.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de proteínas totales solubles (PTS) de *C. reinhardtii* transgénica y silvestre.

Los extractos de PTS procedentes de la cepa transformada E-760 inducida a 35°C mostraron mayor inactivación que los extractos de PTS de E-760 no inducida contra *Staphylococcus aureus*, *S. agalactiae* y *Enterococcus faecium*, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* los resultados de inactivación entre ambos extractos fueron muy similares. Para *Pseudomonas aeruginosa* el extracto de E-760 no inducido fue el que mayor efecto inhibitorio mostró.

Específicamente para *Staphylococcus aureus* el extracto de PTS de E-760S inducida en ambas concentraciones registró un aumento gradual en la inhibición del crecimiento bacteriano en cada tiempo de exposición evaluado, además de tener un efecto bactericida mayor que el obtenido para la ampicilina. El valor máximo de inactivación para la concentración de 560  $\mu\text{g}$  fue de 0.29 U log a los 120 min de exposición mientras que para la concentración de 1,120  $\mu\text{g}$  fue de 0.34 U log al máximo tiempo evaluado. El mayor efecto bactericida del tratamiento con ampicilina se logró a los 480 min con una inactivación de 0.16 U log. Para ambos extractos de PTS de E-760S no inducida se obtuvieron valores de inhibición mínimas casi comparables con los extractos de la cepa silvestre (Figura 14 a).

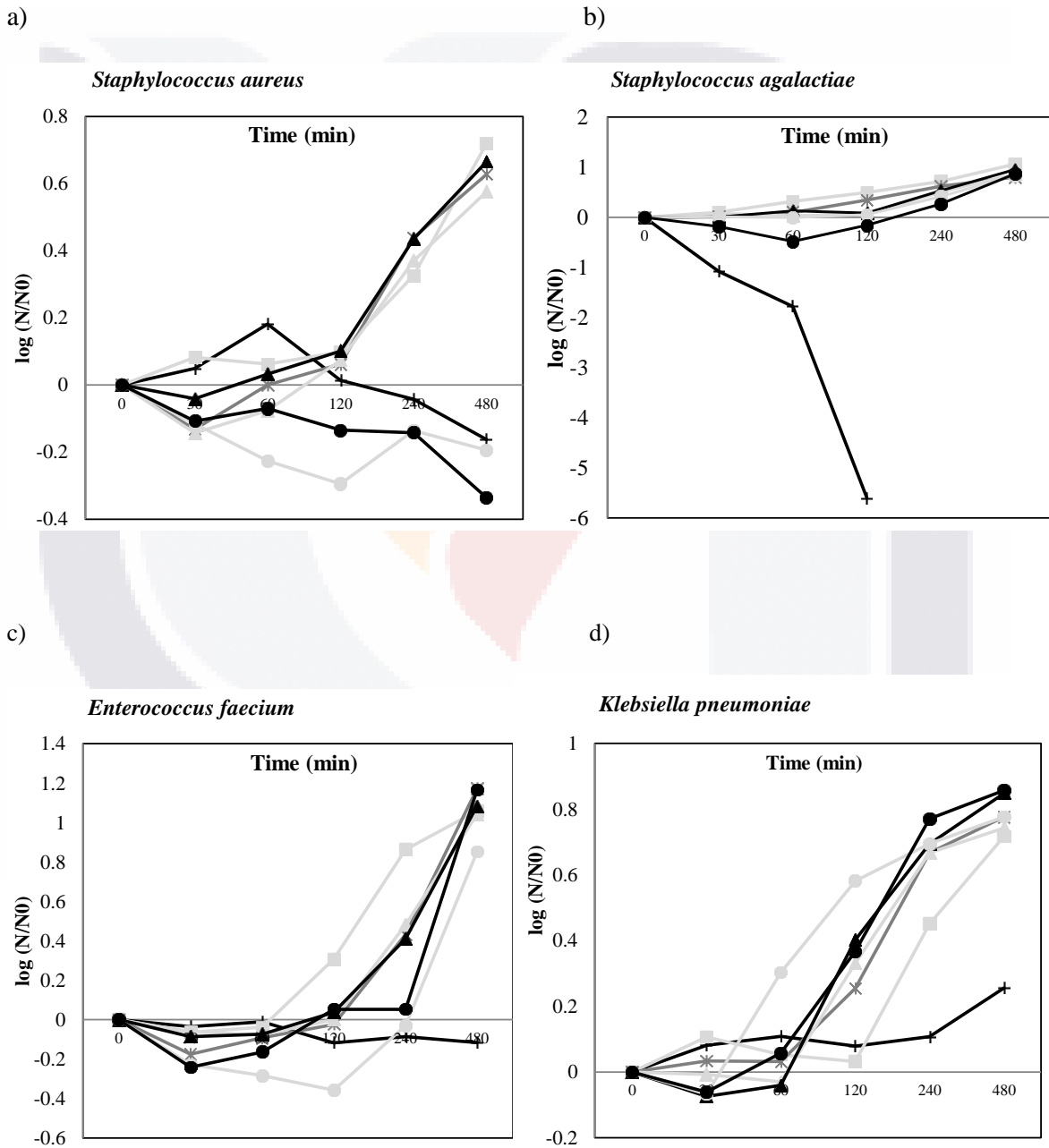
Para *Staphylococcus agalactiae* la ampicilina a 0.3 mg/mL ejerció un fuerte efecto inhibitorio, logrando la inactivación total de las células a los 120 min de exposición. Por su parte el extracto de PTS de E-760S inducido a 1,120  $\mu\text{g}$  fue el que mejor actividad antibacteriana mostró (0.5 U log) a los 60 min. de exposición, sin embargo el crecimiento bacteriano aumento a partir de los 120 min (Figura 14 b).

Para *Enterococcus faecium* el extracto de PTS de E-760S a 560  $\mu\text{g}$  registró la mayor inhibición (0.36 U log) a los 120 min. de exposición, sin embargo el crecimiento aumentó a partir de los 240 min. A los 30 min de exposición todos los tratamientos analizados registraron una ligera inactivación, sin embargo a partir de los 60 min la cinética de crecimiento de la bacteria aumentó considerablemente (Figura 14 c).

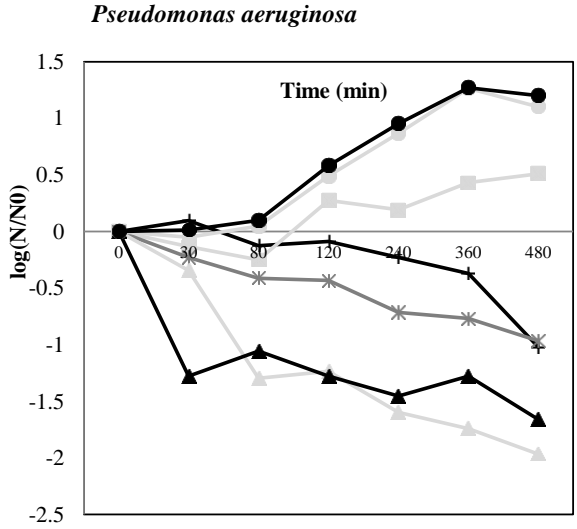
Específicamente para *K. pneumoniae* las PTS tanto de E-760S inducida como no inducida ejercieron una ligera inactivación a los 30 min de exposición (0.6 U log), sin embargo al transcurrir el tiempo de incubación la cinética de crecimiento aumento considerablemente, incluso superando al número de UFC del control positivo (Buffer de Fosfatos) en el mayor tiempo de exposición (480 min) (Figura 14 d).

Para *P. aeruginosa* los extractos de PTS de E-760 no inducida en ambas concentraciones resultaron más eficientes. El valor máximo de inactivación se registró al mayor tiempo de exposición, siendo 560  $\mu\text{g}$  de PTS la concentración que mayor inhibición registró (1.9 U log) mientras que para la concentración de 1,120  $\mu\text{g}$  fue de 1.6 U log. Las

PTS de WT también mostraron inactivación (0.9 U log) contra *P. aeruginosa*, registrada hasta el máximo tiempo de exposición. Cabe destacar que los extractos de PTS antes mencionados fueron más eficientes en la inhibición bacteriana que la ampicilina (0.3 mg/mL) ya que su valor máximo de inactivación fue de 1 U log a los 480 min (Figura 14 e).



e)



**Figura 14.** Inactivación bacteriana por extractos de PTS de WT, E-760S y E-760S Inducida

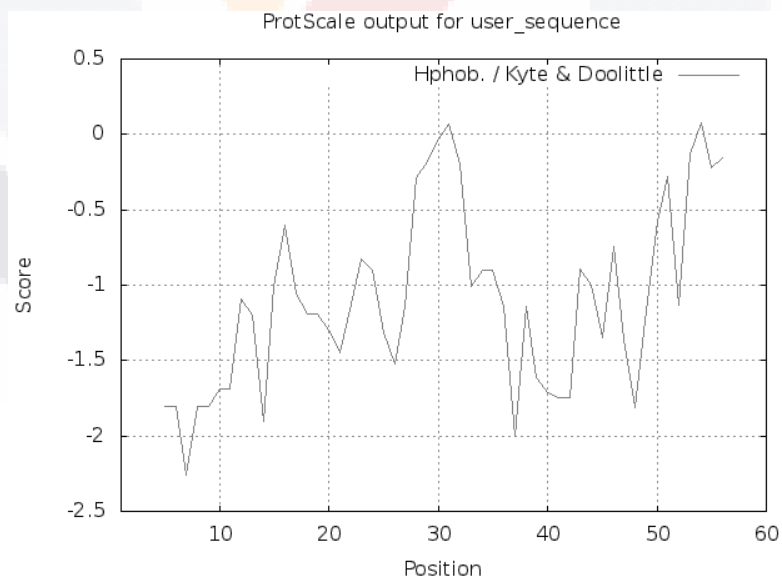
—+— Ampicilina 0.3 mg/mL; —■— PB, buffer fosfato de potasio 0.05 M pH 7; —\*— WT, *C. reinhardtii* cepa silvestre 560 mg/mL PTS; —▲— E-760S, *C. reinhardtii* cepa transgénica 560 mg/mL PTS; —▲— E-760S, *C. reinhardtii* cepa transgénica 1,120 mg/mL PTS; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* cepa transgénica Inducida a 35°C ·10 min, 560 mg/mL PTS; —●— E-760S Ind, *C. reinhardtii* cepa transgénica Inducida a 35°C ·10 min, 1,120 mg/mL PTS.

## 6.2. Estrategia 2. Unión de amplicones de *M. oleifera*

### 6.2.1. Búsqueda y análisis bioinformático de péptidos antimicrobianos en *M. oleifera*

Se han reportado dos péptidos con capacidad antimicrobiana en *M. oleifera*, el denominado FLO (Suarez *et al.*, 2003) y el llamado *Mo*-CBP<sub>3</sub> (Gifoni *et al.*, 2012). El péptido FLO esta compuesto por 60 aminoácidos cuya secuencia es QGPGRQPDFQRCGQQLRNISPPQRCPSLRQAVQLTHQQGQVGPQQVRQMYRVASNIPST y posee actividad bactericida contra bacterias patógenas como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella* resistentes a antibióticos. Por su parte el péptido *Mo*-CBP<sub>3</sub> se compone de 22 aminoácidos (CPAIQRCCQQLRNIIQPPCRCCQ) y muestra actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* y *C. gloesporioides*.

El análisis de los parámetros fisicoquímicos mostró que el péptido FLO está compuesto por 52% de residuos hidrofílicos (QGCNSTY), 33% de residuos hidrofóbicos (PFLIAVM), 13 % de residuos básicos (RH) y 2 % (D) y con un peso hipotético de 6.7 kDa, un punto isoeléctrico (pI) de 11.6 y un GRAVY de -1.105 (Figura 15).

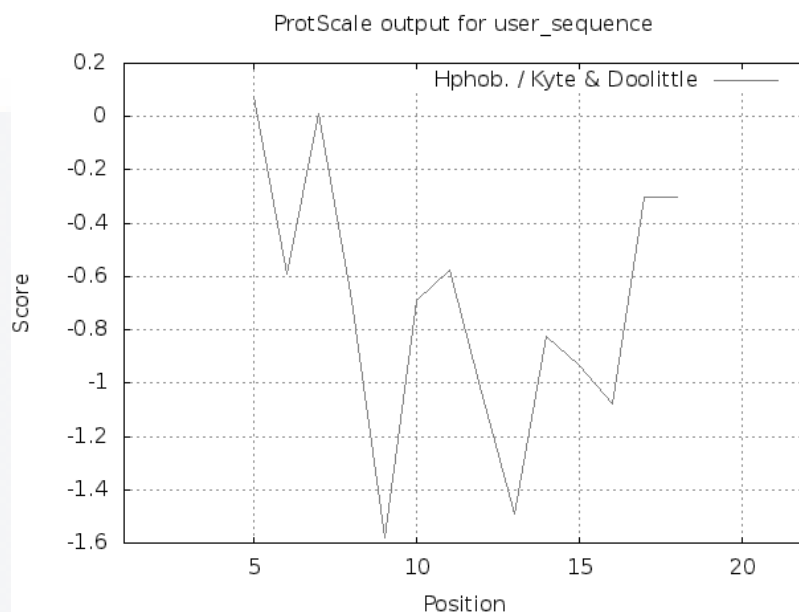


**Figura 15.** Hidropaticidad de aminoácidos de FLO

Los datos graficados se obtuvieron en base a la escala de Kyte y Doolittle (1982) donde entre menor es el valor más hidrofílico es el aminoácido.



Mientras que el péptido *Mo*-CBP<sub>3</sub> está compuesto por 54% de residuos hidrofílicos (CQN), 32 % de residuos hidrofóbicos (PAIL), un 14% de residuos básicos (R) y con un peso hipotético de 2.5 kDa, un punto isoeléctrico (pI) de 8.7 y un GRAVY de -0.441 (**Figura 16**).

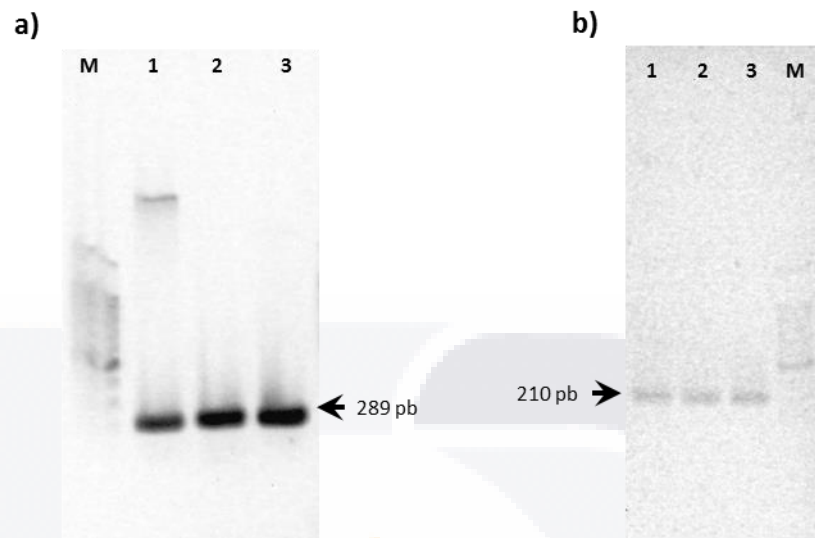


**Figura 16.** Hidropaticidad de aminoácidos de *Mo*-CBP<sub>3</sub>

Los datos graficados se obtuvieron en base a la escala de Kyte y Doolittle (1982) donde entre menor es el valor más hidrofílico es el aminoácido.

### 6.2.2. Amplificación de fragmentos de interés

Se realizó un análisis de astringencia por medio de un PCR utilizando gradiente de temperaturas (50, 55 y 60 °C). Para ambos pares de oligonucleótidos [*Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO] se obtuvieron amplificaciones con longitud similar a la esperada para las 3 temperaturas analizadas (Figura 17). Se purificaron los amplicones para su secuenciación y se clonaron en el vector pGEM-T® Easy.



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR de *M. oleifera*

a) Amplicón *Mo*-CBP<sub>3</sub>. b) Amplicón FLO. M: Marcador de peso molecular (100 pb); 1: Amplicón a 50°C de alineamiento; 2: Amplicón a 55°C de alineamiento; 3: Amplicón a 60°C de alineamiento.

### 6.2.3. Estudio bioinformático de productos amplificados

Los productos amplificados fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), para *Mo*-CBP<sub>3</sub> se obtuvo una secuencia de 277 pb y tiene un porcentaje de identidad del 95% con la secuencia nucleotídica de un precursor de la Albumina 2S de *M. oleifera* (Figura 18).

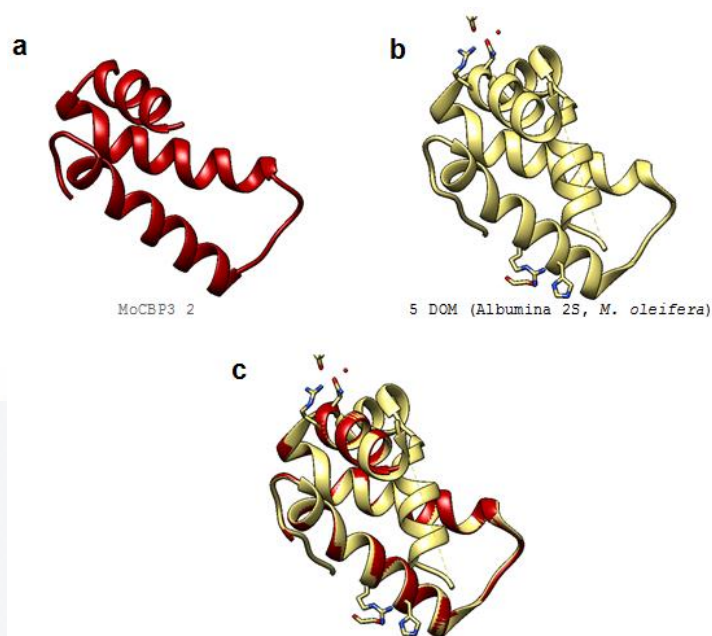
MoCBP3 F	1	CAA---GG-----	5
2S Albumin	1	ACCAAATCCGGCCATATCAATCAGCACTCAGCAGCAACCAACACCACACCCGGCAGTGCTTA	60
MoCBP3 F	6	---TGGGAA-----GGCC---G	16
2S Albumin	61	CAATGGCAAAGTTCACTCTCCTCCTTGCCATCTTCGCTTTGTTCCTCATTCTGGCCAACG	120
MoCBP3 F	17	CC-----TCGA-----	22
2S Albumin	121	CCAACGTCTACCGCACCACTGTCTGAGCTCGACGAGGAACCTGACGACAACCAGCAAGGCC	180
MoCBP3 F		-----	
2S Albumin	181	AGCAGCAGCAGCAATGCCGCCAGCAGTTTTTGACCCATCAACGCCTCAGGGCTTGCCAGC	240
MoCBP3 F	23	-----AGGATGTGGAAGACGACGTTA	43
2S Albumin	241	GCTTCATCCGACGACAGACCCAGGGTGGAGGCCCTCGAGGATGTGGAAGACGACGT-A	299
MoCBP3 F	44	GAAGAAATCCGAGGAAGTGGTGGAGCCCGACAGGCCGTCGACCAGCCATCCAACGTTG	103
2S Albumin	300	GAAGAAATC-GAGGAAGTGGTGGAGCCCGACAGGCCGTCGACCAGCCATCCAACGTTG	358
MoCBP3 F	104	CTGCCAACAGCTACGGAACATACCTCCTCGCTGCAGGTGCCCTTCACTGAGGCAGGCAGT	163
2S Albumin	359	CTGCCAACAGCTGCGGAACATACAGCCTCGCTGCAGGTGCCCTTCACTGAGGCAGGCAGT	418
MoCBP3 F	164	ACAGCTCGCACACCAGCAGCAGGGACAGGTGGGTCTCAACAGGTAAGGCAGATGTACCG	223
2S Albumin	419	ACAGCTCGCACACCAGCAGCAGGGACAGGTGGGTCTCAACAGGTAAGGCAGATGTACCG	478
MoCBP3 F	224	CCTTGCTAGCAACATCCCGCTATGTGCAACCTGCGGCCA-TGA-----A	267
2S Albumin	479	CCTTGCTAGCAACATCCCGCTATGTGCAACCTGCGGCCAATGAGCTGCCCATTCGGTCA	538
MoCBP3 F	268	GCA---AGCT-----AG	277
2S Albumin	539	GCAGTGAAGCTTGTGGCTGTAAACTATATGGCCCTGGTGGTCAACAGTACTCATGCACGA	598

**Figura 18.** Resultados del alineamiento de la secuencia producto de Mo-CBP3 con el oligonucleótido Forward

La traducción virtual de *Mo-CBP<sub>3</sub>* mostró que codifica para el péptido de interés dentro del marco de lectura 1 de la orientación 5'3'. El modelado tridimensional del péptido mostró que está conformado por 3  $\alpha$ -hélices y 3 bucles, por su parte un análisis de búsqueda de modelos proteicos arrojaron una similitud estructural con la estructura proteica 5 DOM característica de la fracción proteica albumina 2S en *Moringa oleifera* (Figura 19).

**Traducción Virtual**

> 5' 3'. Frame 1  
 PRSECRPTTDVEDDVEEIEEVVEPDQARRPAIORCCOOLRNIOPRCRCPSLRFQAVQLAHQQGQVGPQQVQRQMYRLASNIP  
 AICNLRP-AKLR



**Figura 19.** Modelado de la estructura terciaria del péptido *Mo-CBP<sub>3</sub>*

a) Modelo tridimensional putativo *Mo-CBP<sub>3</sub>*. b) Dominio 5 DOM característico de la Albumina 2S de *M. oleifera*. c) Empalme de ambas estructuras

Por otra parte, la secuencia en nucleótidos de FLO fue de 301 pb que tiene un porcentaje de identidad del 99% con la secuencia nucleotídica de un precursor de la Albumina 2S de *M. oleifera* (Figura 20).

```

FLO_F      Query 1      T-----GG----- 3
2S Albumin Sbjct 1      TCCATCGAGTCATATCACTCACTATCATCAGTATATCAGAAGCAGITTACCATTGGCAAAG 60
FLO_F      Query 4      -----GGT----- 6
2S Albumin Sbjct 61      ATCACTCTCCTCCTCGCCACCTTCGGTTTGGCTCCTTCTCCTGACCAACGCITCTATCTAC 120
FLO_F      Query 7      -----ACT-----TGACATAA----- 18
2S Albumin Sbjct 121     CGCACAACTGTGAGCTCGACGAGGAGGCTGACGAGAACCCAGCAGCAGAGATGTGCCAG 180
FLO_F      Query
2S Albumin Sbjct 181     CAATTCAGACCCACCAGCGCCTCAGGGCGTGCCAGCGCTTCATCCGGCGACGGACCCAG 240
FLO_F      Query 19      -----GGTT-----CG-----TGGAG 29
2S Albumin Sbjct 241     GGTGGAGTCCCTTGGACGAGGTTGAAGACGAAGTAGACGAAATCGAAGAGTGTGGAG 300
FLO_F      Query 30      CCCGACCAGGTCCTCCGCTCGACAACCGGCCTTCCAGCGTTGCTGCCAACAGCTGCGGAAC 89
2S Albumin Sbjct 301     CCCGACCAGGTCCTCCGCTCGACAACCGGCCTTCCAGCGTTGCTGCCAACAGCTGCGGAAC 360
FLO_F      Query 90      ATATCTCCTCCTTGCAGGTGCCCATCACTCAGGCAAGCAGTACAGTTGACACACCCAGCAG 149
2S Albumin Sbjct 361     ATATCTCCTCCTTGCAGGTGCCCATCACTCAGGCAAGCAGTACAGTTGACACACCCAGCAG 420
FLO_F      Query 150     CAGGGACAGTGGGTCTCAGCAGGTAAGGCAGATGTACCAGCGTCCGCTAGCAACATCCCC 209
2S Albumin Sbjct 421     CAGGGACAGTGGGTCTCAGCAGGTAAGGCAGATGTACCAGCGTCCGCTAGCAACATCCCC 480
FLO_F      Query 210     TCCATGTGCAACCTGCAGCCGATGAGCTGCCCTTCCGTCAGCAGCAAGCTCGTGGCTC 269
2S Albumin Sbjct 481     TCCATGTGCAACCTGCAGCCGATGAGCTGCCCTTCCGTCAGCAGCAAGCTCGTGGCTC 540
FLO_F      Query 270     TAAACTGTATGGCCA-----AC-----TAGTCC----- 293
2S Albumin Sbjct 541     TAAACTGTATGGCCATAAGGTGGTCACGTGCAATGCACGAGGATAATAGACCTTAC 600
FLO_F      Query
2S Albumin Sbjct 601     TCTTGCCAGCCCTTCACTGACAAGGGTAACGAGCTATGTAATAATAAAGCACATAGTAT 660
FLO_F      Query 294     -----ATGGA----- 298
2S Albumin Sbjct 661     CGTGTGCGTTTATGGAGCTGAAAGCTAGCTAGTAGTGTCTCAAATGTACCCCGTGTATC 720
FLO_F      Query
2S Albumin Sbjct 721     AGATAAATRACTCAGCCTCTTTTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 780
    
```

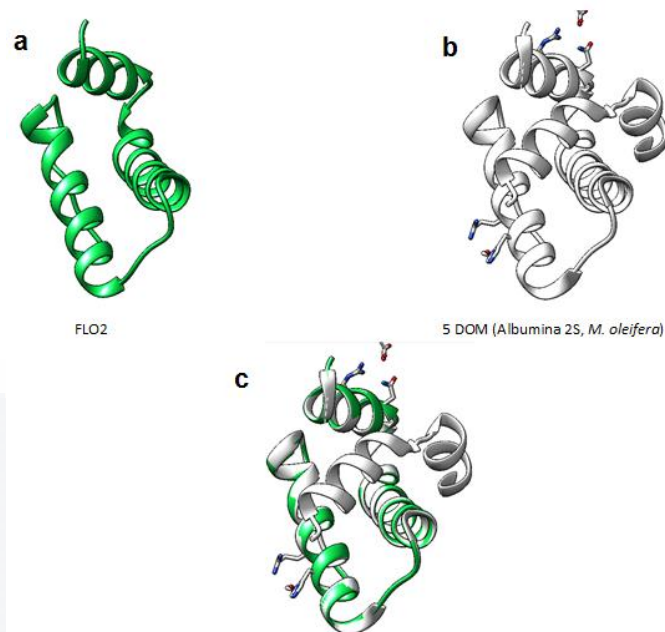
Figura 20. Resultados del alineamiento de la secuencia producto de FLO con el oligonucleótido Forward

La traducción virtual de FLO mostró que codifica para el péptido de interés dentro del marco de lectura 3 de la orientación 5'3'. El modelado tridimensional del péptido mostró que está conformado por 3  $\alpha$ -hélices y 3 bucles, por su parte un análisis de búsqueda de modelos proteicos arrojaron una similitud estructural con la estructura proteica 5 DOM característica de la fracción proteica albumina 2S en *Moringa oleifera* (Figura 21).

**Traducción Virtual**

> 5' 3'. Frame 3

GYLTIRFVEPDDQGPGRQPAFQRCCOOLRNI SPPCRCP SLRQAVOLTHOQQGQVGPQOVROMYRVASNIPSMCNLQPMSCPF  
RQQQSSWL-TVWPN-SME

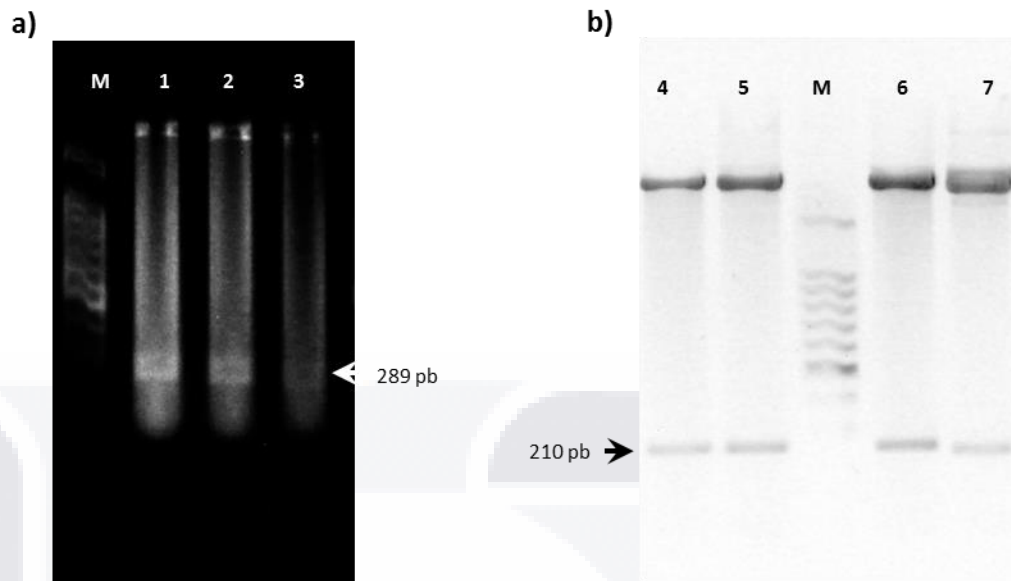


**Figura 21.** Modelado de la estructura terciaria del péptido FLO

a) Modelo tridimensional putativo FLO (2). b) Estructura tridimensional del dominio 5 DOM característico de la Albumina 2S de *M. oleifera*. c) Empalme de ambas estructuras

#### 6.2.4. Clonación de los fragmentos de interés en los vectores pGEM-T® Easy y pET 32

Con el fin de obtener suficiente concentración de ambos amplicones para los ensayos posteriores estos fueron clonados en el vector pGEM-T® Easy. La ligación de cada amplicón al vector se confirmó por ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* (Figura 22).



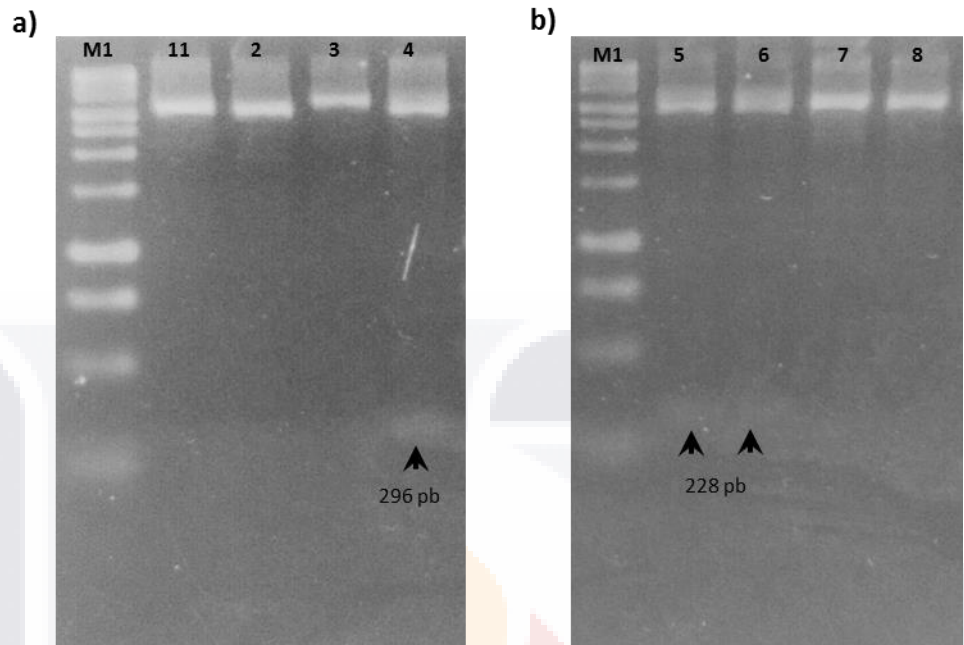
**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción de las construcciones de interés con *EcoRI*

a) Construcción *Mo-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T<sup>®</sup> Easy*. b) Construcción *FLO-pGEM-T<sup>®</sup> Easy*. M: Marcador de peso molecular (100 pb); Carriles 1-3: Clonas putativas de la construcción *Mo-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T<sup>®</sup> Easy*; Carriles 4-7: Clonas putativas de la construcción *FLO-pGEM-T<sup>®</sup> Easy*.

Para corroborar el sentido de la ligación, se realizaron algunos ensayos de restricción con las enzimas *HindIII* y *SacII*. Para el caso de la construcción *Mo-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T<sup>®</sup> Easy*, si el amplicón se ligó en sentido se obtendría un fragmento de ~7 pb (imperceptible) mientras que en aquellas construcciones en antisentido el fragmento esperado fue de 296 pb (Figura 5). Se identificaron 3 construcciones en sentido, mientras que solo una construcción resultó estar en antisentido librándose un fragmento de 296 pb en el ensayo de digestión (Figura 23 a)

Contrario de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, para las clonas con la construcción *FLO-pGEM-T<sup>®</sup> Easy* que se ligaron en sentido, liberaron un fragmento de 228 pb mientras que aquellas que estuvieron en antisentido el fragmento liberado sería de 7 pb (Figura 5). Se identificaron 2 construcciones en sentido ya que se liberó un fragmento de alrededor de 230 pb mientras que en antisentido se identificaron a otras 2 construcciones (Figura 23 b).

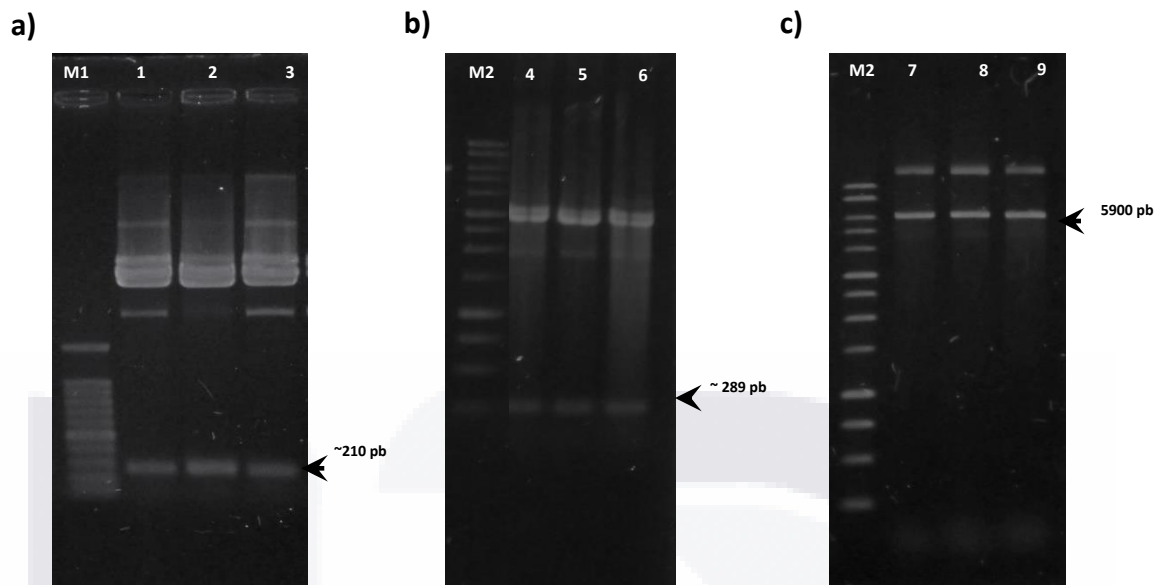




**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar sentido de la ligación por restricción con *HindIII* y *SacII*

a) Construcciones *Mo*-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T® Easy. b) Construcciones FLO-pGEM-T® Easy. M1: Marcador de peso molecular (1 kb); Carriles 1-4: Construcciones *Mo*-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T® Easy; Carriles 5-8: Construcciones FLO-pGEM-T® Easy.

Se realizaron varios intentos para unir ambos amplicones en la misma construcción utilizando el sitio *HindIII* como punto de unión, sin embargo no se obtuvieron resultados. Debido a lo anterior se decidió clonar cada fragmento por separado en el vector de expresión pET32, utilizando las construcciones *Mo*-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T® Easy y FLO-pGEM-T® Easy y se realizó una digestión con *EcoRI* para liberar el fragmento y linealizar el vector pET32 (Figuras 24 a, b y c).



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción con EcoRI de las construcciones de interés

a) Construcción FLO-pGEM-T<sup>®</sup> Easy. b) Construcción *Mo*-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T<sup>®</sup> Easy. c) Vector pET32 linealizado (5900 pb). Carriles: M1: Marcador de peso molecular (100 pb); M2: Marcador de peso molecular (1 kb); 1-3: Clonas putativas de la construcción FLO-pGEM-T<sup>®</sup> Easy; 4-6: Clonas putativas de la construcción *Mo*-CBP<sub>3</sub>-pGEM-T<sup>®</sup> Easy; 7-9: Vector pET32 linealizado.

### **6.3. Estrategia 3. Gen sintético FLOGS en *Chlorella vulgaris***

#### **6.3.1. Diseño de gen sintético FLOGS**

Se diseñó un gen sintético basado en la secuencia del polipéptido MO 2.1 reportado en *Moringa oleifera* (Gassenschmidt *et al.*, 1995) denominado FLO por Suarez *et al.*, (2003), el cual presenta actividad antibacteriana y floculante. El gen sintético denominado en este trabajo FLOGS consta de 243 nucleótidos y se diseñó con los siguientes componentes: sitios de restricción *Nco*I los cuales flanquean en los extremos 5' y 3' al gen sintético; etiqueta de histidinas para realizar la identificación, recuperación y purificación de la proteína recombinante; un sitio de reconocimiento de proteasa trombina que permite la eliminación del péptido N-terminal para la producción de la proteína nativa; polipéptido FLO, que es el péptido de interés con actividad antibacteriana-floculante; un codón de paro (Stop) y por último un sitio de unión a ribosomas (Figura 6 y 7).

#### **6.3.2. Selección de líneas transformantes de *Chlorella vulgaris***

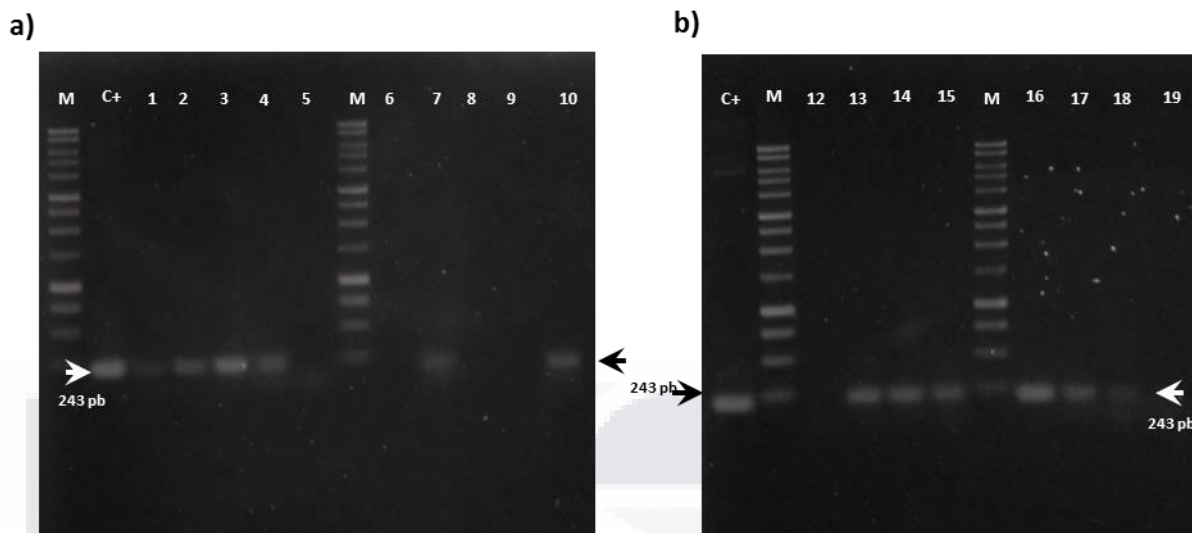
Después del bombardeo con los microproyectiles que contenían la construcción FLOGS / p464 hacia las células de *C. vulgaris* se procedió a la selección de las líneas transformantes por medio de 5 rondas de selección en medio TAP sólido adicionado con espectinomicina (3 rondas a una concentración de 100 mg/L y dos rondas de 150 mg/L). Se logró separar 25 posibles transformantes (Figura 25) las cuales fueron utilizadas para comprobar la presencia del transgen en posteriores análisis.



**Figura 25.** Selección de transformantes putativas de *C. vulgaris*. Crecimiento en medio TAP con espectinomicina (100 mg/L).

### **6.3.3. Confirmación de la integración del gen sintético FLOGS en el genoma plastídico de *C. vulgaris***

Cada una de las clonas se crecieron en medio TAP líquido adicionado con espectinomicina (100 mg/L) para realizar la extracción de ADN genómico y utilizarlo para realizar una PCR y determinar si las clonas de la microalga estaban transformadas utilizando el par de oligonucleótidos dirigidos a amplificar el gen sintético FLOGS (243 pb). Se identificaron 12 posibles clonas transformadas con el gen sintético FLOGS (Figura 26), las cuales fueron secuenciadas con el par de oligos codificantes para FLOGS.



**Figura 26.** Gel de electroforesis al 1% de amplificación por PCR del gen FLOGS en 20 clonas putativas de *C. vulgaris*

a) Producto de PCR para el gen sintético FLOGS, clonas 1-10. b) Producto de PCR para el gen sintético FLOGS, clonas 12-19. M: Marcador de peso molecular (1 kb); C+: Control construcción FLOGS / p464.

De acuerdo a los resultados de secuenciación de las 12 clonas, todas resultaron transformadas con el gen sintético FLOGS. Según el alineamiento entre la secuencia producto de la clona 13 con el oligonucleótido FLOGS Forward y la secuencia del gen sintético FLOGS se obtuvo un alto grado de identidad desde la posición 20 hasta la 185 (Figura 27 a), que comprende la secuencia codificante para el péptido FLOGS (resaltado-subrayado). Se identificó parcialmente el oligonucleótido Forward (amarillo) mientras que el oligonucleótido Reverse se identificó completamente (verde). Además se encontró identidad del 100% entre la secuencia producto de la clona 13 y la secuencia reportada en la NCBI para la proteína floculante en semillas de *M. oleifera*, la cual fue utilizada para el diseño del gen sintético FLOGS (Figura 27 b).

a)

FLOGS	1	TCATTTAGTTCCTCGTGGTAGTCAAGGTCAGGTCGTC AACCGATTTC	50
CH13-F	1	AATATA-----TAGAC-----GGCTGTC-----	18
FLOGS	51	AACGTTGTGGTCAACAATTACGTAATATTTCTCCTCCTCAACGTTGTCCA	100
CH13-F	19	ACGTTGTGGTC-ACAATTACGTAATATTTCTCCTCCTCAACGTTGTCCA	66
FLOGS	101	TCATTACGTCAAGCTGTTC AATTAACACATCAACAACAAGGTC AAGTAGG	150
CH13-F	67	TCATTACGTCAAGCTGTTC AATTAACACATCAACAACAAGGTC AAGTAGG	116
FLOGS	151	TCCACAACAAGTTCGTCAAATGTATCGTGTAGCATCAAATATTCATCAA	200
CH13-F	117	TCCACAACAAGTTCGTCAAATGTATCGTGTAGCATCAAATATTCATCAA	166
FLOGS	201	CATAAAGGAGGACAGCCAT---	219
CH13-F	167	CATAAAGGAGGACAGCCATGAA	188

b)

MO 2.1=flocculating protein [Moringa oleifera, seeds, Peptide, 60 aa]  
 Sequence ID: [AAB34890.1](#) Length: 60 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 60 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
47.4 bits(111)	2e-05	Compositional matrix adjust.	46/46(100%)	46/46(100%)	0/46(0%)	+1

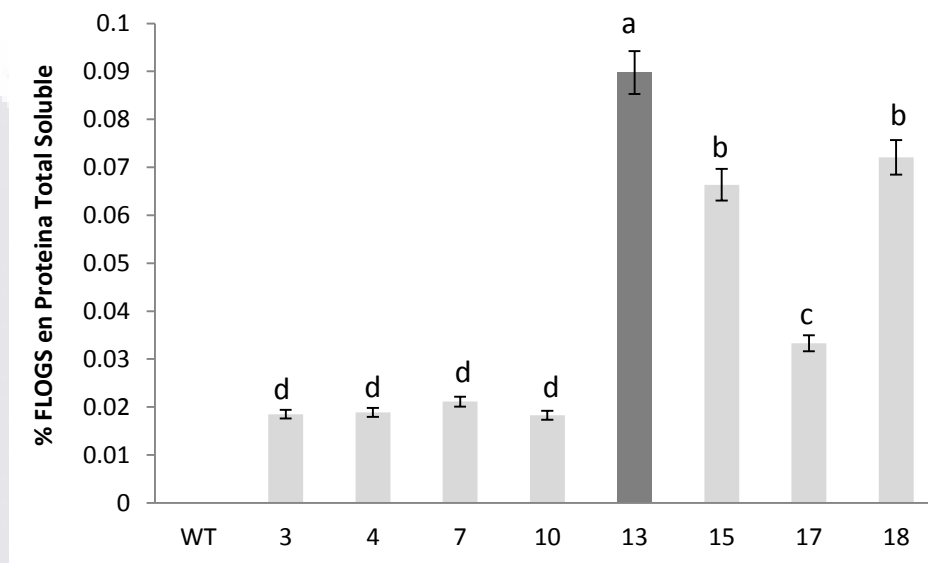
Query	31	QLRNISPPQRCPSLRqavqlthqqggvgppqvrqMYRVASNIPST	168
Sbjct	15	QLRNISPPQRCPSLRQAVQLTHQOQGVGPOQVROMYRVASNIPST	60

**Figura 27.** Resultados del alineamiento y análisis por Blastx de la secuencia producto de FLOGS con el oligonucleótido Forward

### 6.3.4. Cuantificación por ELISA de la proteína recombinante FLOGS.

El nivel de expresión del gen FLOGS se evaluó en 8 de las 12 transformantes putativas de *C. vulgaris* mediante ensayo de ELISA y se comparó con la cepa silvestre de *C. vulgaris*, se utilizó como estándar una proteína de tamaño similar a FLOGS. La cantidad de proteína FLOGS se expresó como porcentaje de PTS, teniendo que la transformante número 13 fue la que mayor nivel de expresión de la proteína recombinante registro, con el 0.09%, seguido de las clonas número 18 y 15 con 0.072 y 0.066 %, respectivamente

(Figura 28). En base a esta cuantificación se procedió a cultivar a mayor escala la clona número 13 para las pruebas de funcionalidad posteriores.



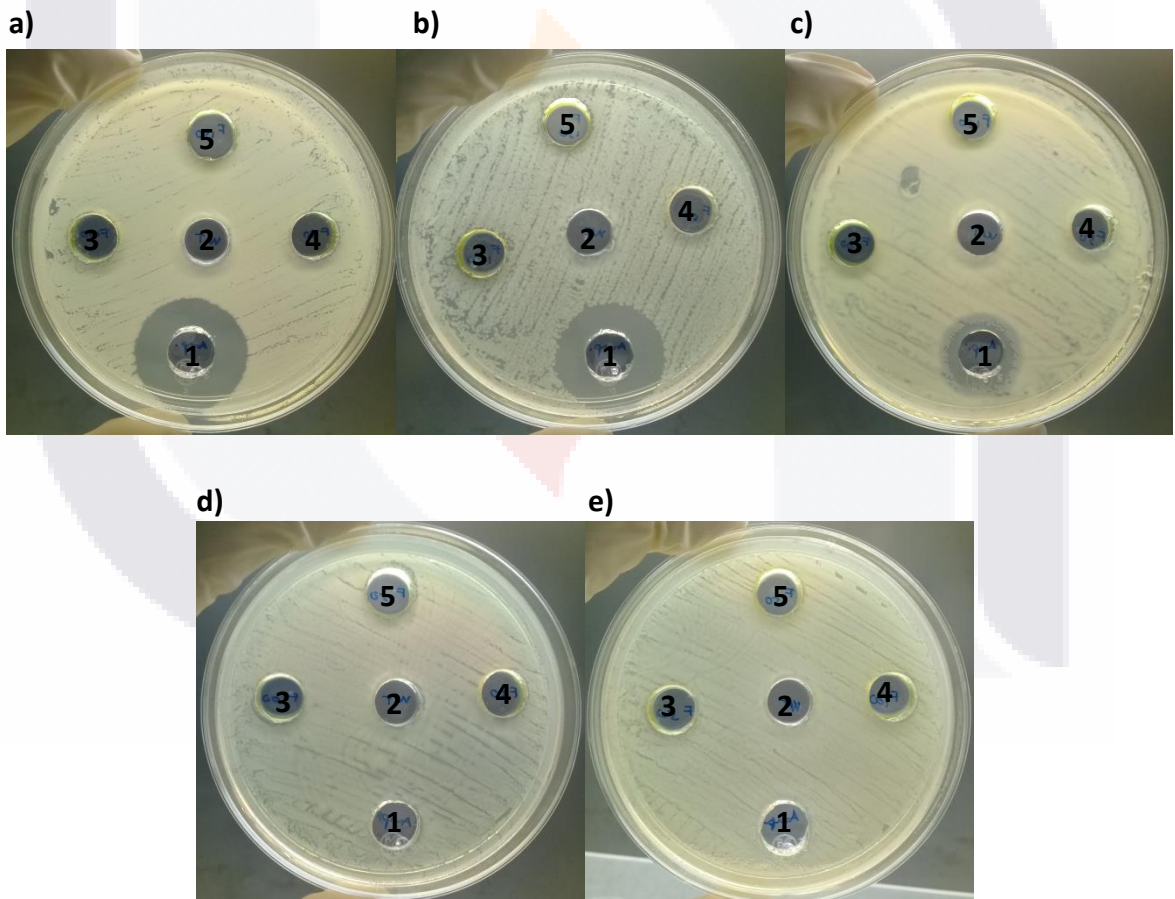
**Figura 28.** Niveles de acumulación de la proteína recombinante FLOGS en las líneas transgénicas evaluadas de *C. vulgaris* mediante ensayo de ELISA.

La cuantificación de la proteína recombinante por ensayo de ELISA se determinó en una concentración conocida de PTS de *C. vulgaris* transformada (500 ng/pocillo) y estandarizada contra una curva lineal de una cantidad conocida del estándar de una proteína de tamaño similar. La cantidad de proteína fue expresada como el porcentaje de PTS. La absorbancia de las PTS de la cepa silvestre (WT) utilizada como control fue casi igual a la del fondo de los pocillos de la placa. El ensayo se realizó con un anticuerpo dirigido a la etiqueta de histidinas. Los valores son promedios de dos replicas con desviaciones estándar. WT: *C. vulgaris* sin transformar; 3, 4, 7, 10, 13, 15, 17 y 18: líneas transgénicas de *C. vulgaris* transformadas con FLOGS. La significancia estadística entre líneas transgénicas y la cepa silvestre se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional mediante la prueba de Tukey. Cada lectura se hizo por duplicado. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre líneas transgénicas ( $P < 0.05$ ).



### 6.3.5. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de proteínas totales solubles (PTS) de *C. vulgaris* transgénica y silvestre.

Los extractos de PTS procedentes de la cepa 13 transformada con FLOGS no mostraron efecto inhibitorio aparente hacia ninguna de las cepas evaluadas en las 3 concentraciones analizadas (50, 100 y 150  $\mu\text{g}$  de PTS), el extracto de la cepa silvestre resulto sin efecto, por su parte la ampicilina fue eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y medianamente contra *Klebsiella oxytoca* ya que se observó un halo de inhibición de 18 mm y de 10 mm respectivamente (Figura 29 a, b y c), mientras que para *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* no mostró ningún efecto inhibitorio (Figura 29 d y e).



**Figura 29.** Análisis de funcionalidad de extracto de PTS que contiene la proteína recombinante FLOGS.

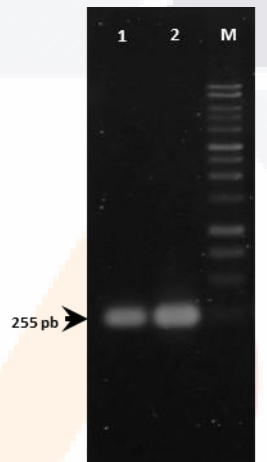
a) *S. aureus*; b) *S. agalactiae*; c) *K. oxytoca*; d) *E. coli*; e) *E. aerogenes*. Pocillo 1: Ampicilina 0.5 mg/mL; 2: 50  $\mu\text{g}$  PTS *C. vulgaris* cepa silvestre; 3: 50  $\mu\text{g}$  PTS *C. vulgaris* con transgen FLOGS; 4: 100  $\mu\text{g}$  PTS *C. vulgaris* con transgen FLOGS; 5: 150  $\mu\text{g}$  PTS *C. vulgaris* con transgen FLOGS.



## 6.4. Estrategia 4. gBlock péptidos *Mo*-CBP<sub>3</sub> – FLO

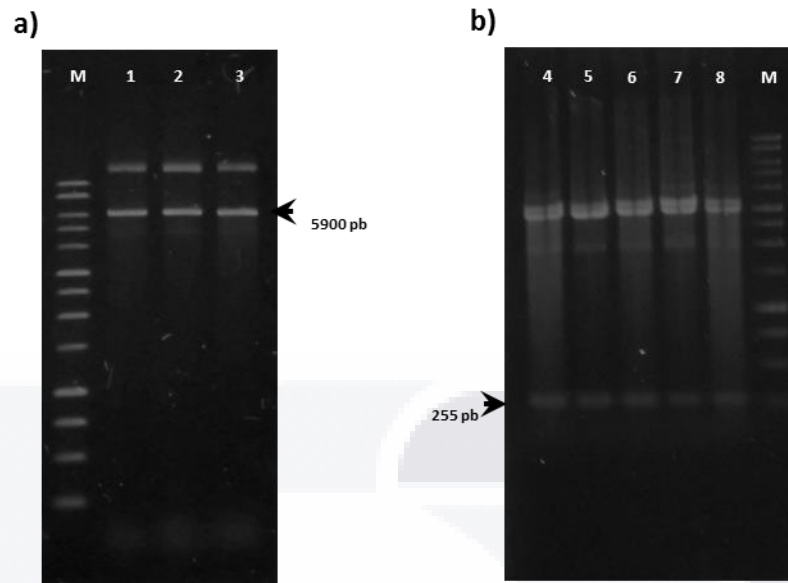
### 6.4.1. Amplificación de fragmentos de interés por PCR y clonación en pGEM-T® Easy

Se realizó un PCR con gradiente de temperatura siendo evaluadas 50 y 60°C obteniendo amplificación en ambas temperaturas (Figura 30).



**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de PCR para amplificación del gBlock a dos temperaturas de alineamiento. M: Marcador de peso molecular (1 kb); Carril 1: Amplicón a 55°C de alineamiento; Carril 2: Amplicón a 60°C de alineamiento.

Una vez obtenidos los amplicones se purificaron con el objetivo de clonarlos en el vector pGEM-T® Easy para propagar la clonas transformadas y obtener mayor concentración para los ensayos de clonación posteriores. Se realizó un ensayo de restricción con la enzima *Eco*RI para la liberación del gBlock de la construcción gBlock / pGEM-T® Easy y para la linealización del vector pET32 (Figuras 31 a y b) con el fin de obtener secuencias complementarias para su posterior ligación.



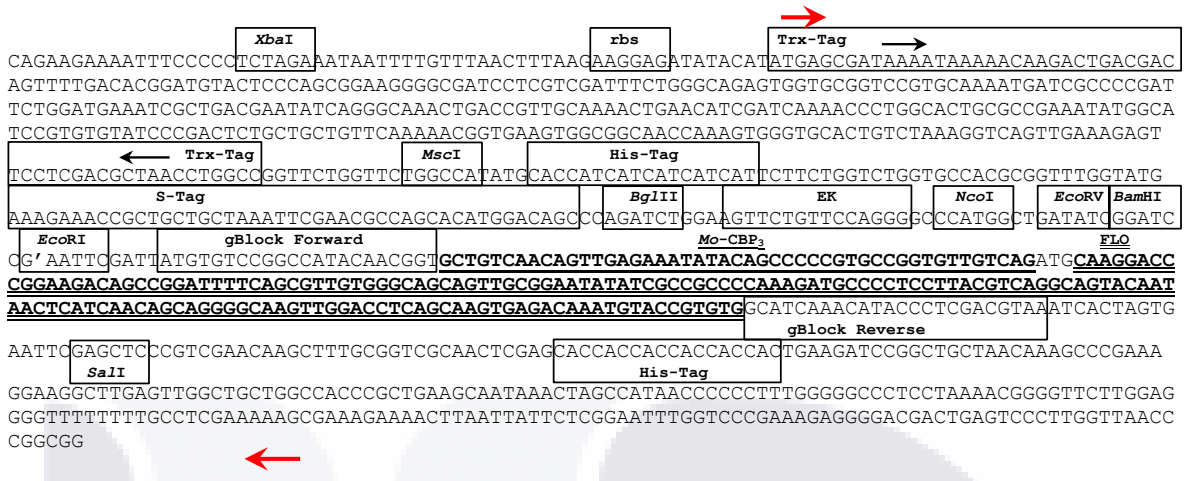
**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ensayo de restricción con *EcoRI*

a) Vector pET32 linealizado (5900 pb). b) gBlock liberado (255 pb) de pGEM-T® Easy. M: Marcador de peso molecular (1 kb); Carril 1-3: Vector pET 32; Carril 4-8: construcción gBlock / pGEM-T® Easy.

Una vez realizada la ligación del gBlock con el vector pET32 se obtuvieron una gran cantidad de clonas putativas a las cuales se les extrajo ADN plasmídico y se envió a secuenciar para verificar el sentido de la ligación.

#### 6.4.2. Confirmación de la ligación e integridad del ORF del gBlock en el vector pET32

La correcta integración del gBlock al vector pET32 e integridad del ORF fue confirmada por secuenciación. Se utilizó el par de oligonucleótidos T7 (Forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'; Reverse 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3') los cuales flanquean la región que codifica para la proteína recombinante. En la figura 32 se muestra la secuencia producto en la cual se encuentran todos los elementos necesarios para la correcta traducción de la proteína, se encuentra señalado con una flecha roja el codón de inicio de la traducción en la cual está comprendida la etiqueta de tiorredoxina, en dicha secuencia se puede verificar que el ORF del gBlock no se modificó, se corroboró con la respectiva traducción virtual de la proteína, en donde se aprecia que se encuentran integras las secuencias codificantes para ambos péptidos que conforman en gBlock.



**Figura 32.** Secuencia producto de construcción gBlock/pET32 con oligonucleótido Forward.

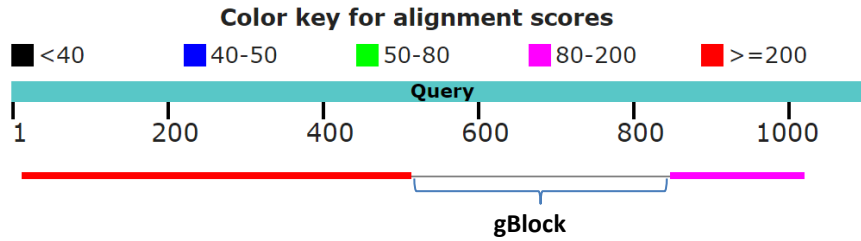
Donde se señalan cada uno de los elementos que se encuentran rio debajo de la secuencia promotora T7. rbs: sitio de unión a ribosomas; Trx-Tag: etiqueta para tioredoxina; His-Tag: etiqueta de histidinas; EK: sitio enteroquinasa (parcial); *XbaI*, *MscI*, *BgIII*, *NcoI*, *EcoRV*, *BamHI*, *EcoRI*, *SaII*: sitios de restricción; *Mo-CBP<sub>3</sub>* y *FLO*: péptidos que conforman el gBlock; Oligonucleótidos Forward y reverse para gBlock.

**Traducción virtual**

5'3' Frame 1  
 QKKISPSRNNFV-L-EGDIHMSDKIKTRLTTVLTRMYSQRKGRSSISGQSGAVRAK-SPRFWMKSLTNIRAN-PLQN-TSIKTLALRRNMASVCIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHSSGLVPRGLV-KKPLLLNSNASTWTAQIWKFCSRGPWLISDPNSIMCPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQMGPGRQPDFQRCGQLRNISPQRCPSLRQAVQLTHQQGQVGPQQVRQMYRVASNIPST-ILVNSSSRRTSFAVATRAPPPLKIRLLTKPERKA-VGCWPPAEAIN-P-PPFGPPKTFLEGGFFLPRKSERKLNYSRNLVPEKGTTESLG-PG

En el alineamiento de la secuencia producto realizado con la herramienta Blast n de la plataforma del NCBI se observa que la secuencia del vector pET32 esta interrumpida con la secuencia correspondiente al gBlock (Figura 33 a), con la secuencia hacia el extremo 5' del gBlock se obtuvo un porcentaje de identidad del 98% mientras que la secuencia al extremo 3' se obtuvo una identidad del 87% (Figura 33 b).

a)



b)

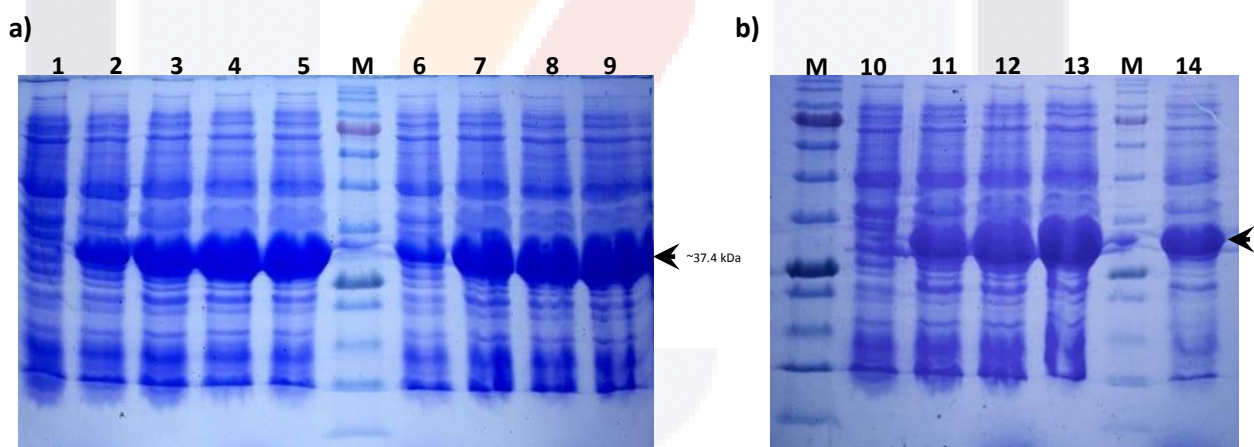
Expression vector pET32a-LIC, complete sequence  
 Sequence ID: [EF442786.1](#) Length: 7889 Number of Matches: 2

Range 1: 5163 to 5662		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match ▲ P
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
861 bits(466)	0.0	490/501(98%)	3/501(0%)	Plus/Plus
Query 15	CCCCCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAA-	73		
Sbjct 5163	CCCCCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAAAT	5222		
Query 74	TAAAACAAGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTAAGTCCCAGCGGAAGGGGCGATCCT	133		
Sbjct 5223	TATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTAAGTCAAAGCGGACGGGGCGATCCT	5282		
Query 134	CGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCAGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGA	193		
Sbjct 5283	CGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCAGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGA	5342		
Query 194	AATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCC	253		
Sbjct 5343	AATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCC	5402		
Query 254	TGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGTGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACG	313		
Sbjct 5403	TGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTG-GTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACG	5461		
Query 314	GTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCG	373		
Sbjct 5462	GTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCG	5521		
Query 374	ACGCTAACCTGGCCGGTTCGGTTCGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTG	433		
Sbjct 5522	ACGCTAACCTGGCCGGTTCGGTTCGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTG	5581		
Query 434	GTCTGGTGCCACGCGGTT-TGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGC	492		
Sbjct 5582	GTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGC	5641		
Query 493	ACATGGACAGCCAGATCTGG	513		
Sbjct 5642	ACATGGACAGCCAGATCTGG	5662		
Range 2: 7712 to 7863		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
178 bits(96)	4e-40	151/173(87%)	21/173(12%)	Plus/Plus
Query 846	AAGCTTTGCGGTCGCAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTACTGAAGATCCGGCTGCTAA	905		
Sbjct 7712	AAGC-TTGCGGCCGC-ACTCGAGCACCACCACCACCACC-CTG-AGATCCGGCTGCTAA	7767		
Query 906	CAAAGCCCCGAAAGGAAAGGCTTGAGTTGGCTGCTGGCCACCCGCTGAAGCAATAAACTAGC	965		
Sbjct 7768	CAAAGCCCCGAAAGGAAAG-C-TGAGTTGGCTGCTG-CCACC-GCTGA-GCAATAA-CTAGC	7821		
Query 966	CATAACCCCTTTGGGGGCCCTCCTAAACGGGGTCTTGGAGGGGtttttt	1018		
Sbjct 7822	-ATAACCC--TT-GGGG-CC-TC-TAAA-CGGG-T-CTTG-AGGGGTTTTT	7863		

**Figura 33.** Resultados de alineamiento y análisis por Blast n derivado de la secuenciación con el oligonucleótido T7 Forward. a) Secuencia del vector pET32 interrumpida con la secuencia correspondiente al gBlock. b) Alineamiento de la secuencia producto con secuencia pET32.

### 6.4.3. Análisis de expresión del gBlock en *Escherichia coli* BL21 Star.

Una vez corroborado el sentido y la integridad del ORF de las construcciones de gBlock/pET32 se procedió a transformar *Escherichia coli* BL21 Star para la producción de la proteína recombinante. Obtenidas las transformantes de *E. coli* se procedió a realizar un escrutinio con diversas concentraciones del inductor IPTG - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (0.1, 0.5 y 1 mM) así como diversos tiempos de inducción (1, 2, 4 y 6 h) para determinar las mejores condiciones de expresión de la recombinante. El análisis de las proteínas totales de la transformante bacteriana mediante geles de poliacrilamida al 15% y teñidos con Coomasie reveló una proteína del peso molecular esperado para la construcción de gBlock/pET32 (~37.4 kDa). Dicha proteína se expresó en todas las condiciones de inducción sin importar tiempo ni concentración del inductor, por lo que se determinó que las mejores condiciones de expresión de la proteína recombinante fueron a una concentración de 0.1 mM a las 4 h de inducción (carril 4 Figura 34).



**Figura 34.** Expresión de la proteína gBlock contenida en proteínas totales de *E. coli* BL 21 Star.

Gel de poliacrilamida al 15% donde se percibe el patrón de bandeado a condiciones diversas de inducción. Carriles: 1 y 10) Construcción gBlock/ pET32 sin inducir; 2) gBlock/pET32 inducido 0.1 mM IPTG/ 1 h; 3) gBlock/pET32 inducido 0.1 mM IPTG/2 h; 4) gBlock/pET32 inducido 0.1 mM IPTG/4 h; 5) gBlock/pET32 inducido 0.1 mM IPTG/6 h; M) Protein Marker 5-245 kDa (Jena Bioscience); 6. gBlock/pET32 inducido 0.5 mM IPTG/1 h; 7. gBlock/pET32 inducido 0.5 mM IPTG/2 h; 8. gBlock/pET32 inducido 0.5 mM IPTG/4 h; 9. gBlock/pET32 inducido 0.5 mM IPTG/6 h. 11. gBlock/pET32 inducido 1 mM IPTG/1 h; 12. gBlock/pET32 inducido 1 mM IPTG/2 h; 13. gBlock/pET32 inducido 1 mM IPTG/4 h; 14. gBlock/pET32 inducido 1 mM IPTG/6 h.

## 7. DISCUSIONES

Los péptidos antibacterianos son una alternativa prometedora para la inhibición de patógenos resistentes a antibióticos. Con el fin de lograr una mejor caracterización del péptido de interés (determinar mecanismos de acción, estructura y función, o su uso potencial como medicamento) es necesario obtener una cantidad razonable del péptido, sin embargo, existen algunas cuestiones que impiden su obtención de forma masiva como son: el bajo rendimiento de la síntesis de los péptidos al ser purificados directamente del huésped natural, la producción de potenciales factores nocivos de algunos productores bacterianos y los elevados costos de producción por síntesis química (Parachin *et al.*, 2012, Arbulu *et al.*, 2015). Debido a lo anterior la producción de péptidos antimicrobianos por vías recombinantes, utilizando sistemas de expresión como bacterias (Cao *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011, Mesa-Pereira *et al.*, 2017), levaduras (López-García *et al.*, 2010, Arbulu *et al.*, 2015), microalgas (Mu *et al.*, 2012) y plantas (Zakharchenko *et al.*, 2013) se ha convertido en una área de investigación en rápida expansión (Ingham y Moore 2007).

Los PAMS son catiónicos generalmente, con cargas que varían de +2 a +9. Esta carga positiva es importante para la atracción e interacción inicial con las membranas celulares aniónicas de bacterias y otros microorganismos patógenos, por lo que membranas relativamente menos aniónicas no atraerán electrostáticamente a los PAMS (Ebenhan *et al.*, 2014).

### 7.1. Estrategia 1. Bacteriocina E-760

Respecto a la estrategia de obtención de proteínas recombinantes No. 1, en este estudio se analizó la capacidad de expresión del péptido antibacteriano E-760 por vía recombinante en el núcleo de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma estable para la producción masiva de péptidos de interés. *C. reinhardtii* ha sido reportada

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como una plataforma robusta para la producción de proteínas recombinantes específicamente en cloroplasto (Rasala *et al.*, 2010, Campos-Quevedo *et al.*, 2013). Sin embargo, existen pocos reportes acerca de la producción de proteínas recombinantes en el núcleo de la microalga mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

De acuerdo a sus características físico-químicas, la bacteriocina E-760 puede definirse como un péptido catiónico según los resultados *in silico* ya que contiene un 40.8% de aminoácidos hidrofílicos, 36.7% de residuos hidrofóbicos, lo cual coincide con Line *et al.*, (2008), pero difiere con el punto isoeléctrico ya que ellos reportan que es de 8.7 y nosotros de 9.3. En la mayoría de los PAMS la hidrofobicidad es de alrededor del 50% y es esencial para el funcionamiento del péptido ya que permite que el péptido interactúe y penetre la bicapa de fosfolípidos (Ebenhan *et al.*, 2014), en nuestro caso el péptido E-760 resulto ligeramente hidrofóbico de acuerdo a la escala de Kyte y Doolittle (1982) (Figura 8). La influencia del grado de hidrofobicidad en un PAM sobre la especificidad antibacteriana puede modificarse al utilizar análogos de hidrofobicidad variable, por ejemplo al incrementar la hidrofobicidad en un análogo del péptido Magainin 2 Amide (M2a) se incrementó la actividad contra *E. coli*, por el contrario la selectividad contra *P. aeruginosa* disminuyó (Wieprecht *et al.*, 1997), lo que demuestra la baja correlación entre la hidrofobicidad de los péptidos y su capacidad para permeabilizar biomembranas.

Los péptidos antibacterianos sintetizados por bacterias ácido lácticas (BAL) se dividen en dos clases. La clase I consiste en bacteriocinas denominadas lantibióticos que contienen uno o más residuos de aminoácidos modificados (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Cotter *et al.*, 2013), mientras que la clase II consiste en bacteriocinas que carecen de residuos modificados, son pequeñas (< 10 kDA) y termoestables (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Cotter *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014). Las bacteriocinas de la clase II se dividen en cuatro subclases. La Clase IIa contiene bacteriocinas tipo pediocina que tienen secuencias similares de aminoácidos, la clase IIb contiene la bacteriocinas de dos péptidos, la clase IIc consiste en bacteriocinas cíclicas cuyos extremos N- y C- están unidos covalentemente, y la clase II d contiene bacteriocinas no cíclicas que no muestran similitud en la secuencia de bacteriocinas tipo pediocina (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Cotter *et al.*, 2013). El péptido E-



760 se clasifica dentro de las bacteriocinas de clase II ya que es un péptido pequeño (5.3 kDa), no contiene residuos modificados y es termoestable (Line *et al.*, 2008). Sin embargo, existe cierta discrepancia en cuanto a su clasificación debido a que no cumple por completo con las características distintivas de las bacteriocinas de clase IIa ni de la clase IIb. Algunos autores clasifican a E-760 dentro de la clase IIa (Belguesmia *et al.*, 2011) que se caracteriza por presentar un motivo YGNVxC (donde V puede ser reemplazada por L en algunos casos) en la región N-terminal del péptido (Cotter *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014), pero E-760 carece de este motivo (Fig. 4), mientras que las plataformas UniProt (The UniProt Consortium, 2017) y BACTIBASE (Bactibase disponible en <http://bactibase.hammamilab.org/BAC174>) (Hammami *et al.*, 2007) indican que pertenece a la clase IIb, incluyendo al péptido Amylovorin. Una característica estructural interesante de todas las bacteriocinas de clase II b es la presencia de motivos GxxxG (donde x representa cualquier residuo) y motivos tipo GxxxG [conformados por A (AxxxA) o S (SxxxS)] que facilitan las interacciones hélice-hélice y promueven la oligomerización de péptidos helicoidales transmembranales o dominios de proteínas de membrana (Nissen-Meyer *et al.*, 2010, Kyriakou *et al.*, 2016). En base a lo anterior, la secuencia de E-760 presenta dos motivos GxxxG (GGVGG y GMAGG) y un motivo SxxxS (SFPGS) (Figura 9). A pesar de que E-760 comparte esta singularidad de la clase IIb carece del segundo péptido característico de esta categoría, ya que para lograr una actividad antibacteriana óptima requiere la presencia de ambos péptidos en cantidades aproximadamente iguales (Oppegård *et al.*, 2007, Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

Al no existir modelos estructurales del péptido E-760, se obtuvieron 13 modelos hipotéticos los cuales presentaban estructuras  $\alpha$ -hélice, en la figura 10 se observa un modelo obtenido del PEP-FOLD 3.5 (Lamiable *et al.*, 2016). Es importante mencionar que existen pocos trabajos relacionados con la bacteriocina E-760 (Line *et al.*, 2008, Arbulu *et al.*, 2015) por lo que aún no se ha caracterizado completamente a nivel bioquímico y molecular.

Para la expresión eficiente de E-760S en el núcleo de *C. reinhardtii* se realizó una optimización de codones, ya que transgenes con una fuerte desviación de codones o con



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

bajo contenido de GC son pobremente expresados en *C. reinhardtii* (Barahimipour *et al.*, 2016) debido a que el genoma nuclear de esta microalga presenta un alto contenido de GC (64%) (Merchant *et al.*, 2007). El análisis de PCR con oligonucleótidos específicos demostró la integración del gen E-760S al genoma nuclear de la microalga. La eficiencia de la transformación mediada por *A. tumefaciens* fue buena obteniendo 20 clonas posiblemente transformadas, sin embargo, solo se analizó una clona debido a problemas de contaminación. Existen pocos reportes de transformación genética estable del genoma nuclear de *C. reinhardtii* mediada por *A. tumefaciens*, no obstante se reporta que la frecuencia de transformación de este método es 50 veces mayor que la transformación con perlas de vidrio (Kumar *et al.*, 2004). Se han desarrollado diferentes métodos para la transformación nuclear de microalgas, que incluyen la biobalística (Day *et al.*, 1990, Koop *et al.*, 2007), electroporación (Ladygin 2004, Kang *et al.*, 2015), agitación con perlas de vidrio (Kindle 1990, Neupert *et al.*, 2009) o con fibras de carburo de silicio (Dunahay 1993, Wang *et al.*, 1995, Dunahay *et al.*, 1997), por lo que la investigación relacionada con el uso efectivo de la transformación nuclear mediada por *A. tumefaciens* en microalgas aún es mínima (Kumar *et al.*, 2004, Pratheesh *et al.*, 2014).

La línea transgénica generada con la construcción pChlamy1 / E-760S evidenció que el núcleo de *C. reinhardtii* es un sistema estable en la expresión de proteínas heterólogas. De acuerdo a la cuantificación por ELISA y utilizando el anticuerpo anti-His se determinó que la línea transgénica evaluada produjo entre 0.14 [Cultivo No Inducido (CNI)] y 0.36% [Cultivo Inducido (CI)] de proteína recombinante en extractos de PTS. Se han reportado rendimientos de expresión de transgenes en núcleo de microalgas y plantas muy similares o por debajo de los obtenidos en esta investigación. Por ejemplo para el gen reportero codificante para la proteína verde fluorescente GFP expresada en cepas mutantes de *C. reinhardtii* cuyo rendimiento fue de 0.2 %, valor considerado como relativamente alto para expresión nuclear en algas (Neupert *et al.*, 2009), para el antígeno P24 del VIH obtenido por vía recombinante en *C. reinhardtii* con una acumulación de hasta 0.25% del total de proteína celular (Barahimipour *et al.*, 2016), esta comparación se puede realizar con plantas como tabaco en donde el antígeno P24 del VIH alcanzó una

acumulación de 3.5 mg/g de proteína soluble en hoja (Zhang *et al.*, 2002), en tubérculos de papa donde se expresó la proinsulina humana con un rendimiento de 0.1% de PTS (Arakawa *et al.*, 1998) y en *Arabidopsis* (0.1% del total de proteína en semilla) (Nykiforuk *et al.*, 2006). Estos datos y el hecho de que nuestra clona transgénica acumuló la proteína quimérica a niveles por encima de 0.1% de PTS confirman que el núcleo de la microalga es capaz de producir proteínas heterólogas bajo la conducción de promotor quimérico HSP70A / RBCS2.

El proceso de inducción por aumento de temperatura a 35° C por 10 min resultó más eficaz en la expresión de E-760S en 2.5 veces que en el CNI. Estudios similares fueron reportados Mu *et al.*, (2012), quienes trabajaron con la expresión del péptido antibacteriano Cecropin B por inducción térmica en *C. reinhardtii* bajo el promotor quimérico HSP70A/RBCS2, pero a 40°C por 30 min, sin embargo no mencionan la expresión de la proteína recombinante. En nuestros experimentos, se analizó la inducción a 35°C y a 40°C a 10 y 30 min respectivamente sin embargo, a mayor tiempo de inducción el cultivo celular cambió de un color verde intenso a uno verde amarillento no obstante se procesó la muestra y al realizar la cuantificación por ELISA los valores de la proteína recombinante fueron prácticamente nulos (resultados no mostrados) lo cual podría deberse a la muerte celular. *C. reinhardtii* es una microalga mesofílica cuya temperatura de crecimiento óptima está entre 20-32 °C y la transferencia abrupta a una temperatura por encima del rango de crecimiento ideal desencadena respuestas adaptativas que podrían o no permitir la reanudación del crecimiento o la supervivencia a la nueva temperatura. Una exposición prolongada a temperaturas incompatibles resulta en un cese del metabolismo, clorosis y finalmente muerte celular (Xie *et al.*, 2013).

Respecto al análisis funcional de la bacteriocina recombinante E-760 contra las bacterias analizadas se mostró un efecto inhibitorio moderado que fue mayor al producido por las PTS de la cepa silvestre WT. Para *Staphylococcus aureus* el valor máximo de inactivación (0.34 U log) se obtuvo a los 480 min de exposición mientras que para *Staphylococcus agalactiae* fue de 0.5 U log a los 60 min de exposición, ambos valores de inactivación se registraron con la concentración máxima de PTS (1,120 µg) equivalente a 4

µg/mL de proteína recombinante E-760; estos valores de inactivación resultan muy bajos ya que con este mismo péptido se han reportado valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) con solo 1.6 µg/mL contra el mismo género bacteriano (Line *et al.*, 2008). Para *Enterococcus faecium* la mayor inhibición (0.36 U log) se logró a los 120 minutos con 560 µg de PTS de la cepa inducida, equivalente a 2 µg/mL de E-760S. En un estudio referente al uso de algunos biohíbridos (conjugados de péptidos y polímeros sintéticos) contra *Enterococcus faecalis* utilizaron valores de CMI que fueron desde los 4- >25 µg/mL (Eckhard *et al.*, 2014); por su parte el péptido buwchitin (un péptido derivado del rumen) registro valores mucho más altos de CMI (100-200 µg/mL) contra *E. faecalis* (Oyama *et al.*, 2017), concentraciones muchos más elevadas a las utilizadas en este trabajo. Para *Klebsiella pneumoniae* el mayor efecto inhibitorio se registró a los 30 min de exposición (0.6 U log) a la concentración de 1120 µg de PTS tanto no inducida como inducida (1.6 y 4 µg/mL, respectivamente); este valor de inactivación resulta muy bajo ya que se han reportado CMI de 3.2 µg/mL utilizando E-760 (Line *et al.*, 2008). Para *Pseudomonas aeruginosa* la mayor inhibición (1.9 U log) se logró a los 480 minutos de exposición con 560 µg de PTS de la cepa no inducida, equivalente a 0.8 µg/mL de E-760S; este valor de inactivación resulta muy bajo al ser comparado con el mostrado por el PAM colistina, el cual registro valores de CMI de 0.75 – 1.5 µg/mL en aislados clínicos de *P. aeruginosa* (López-Fabal *et al.*, 2008). Cabe destacar que solo para *S. agalactiae* el tratamiento control de ampicilina (0.3 mg/mL) resulto eficiente ya que ejerció una fuerte actividad bactericida al lograr una completa inhibición a los 120 minutos de exposición, por lo que se podría hipotetizar que las cepas analizadas poseen cierto nivel de resistencia al antibiótico.

Se ha reportado la producción y purificación de E-760 por métodos químicos, y se ha caracterizado como una bacteriocina efectiva de amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *L. monocytogenes*) y Gram-negativas (sero variedades de *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter jejuni*) a concentraciones desde 0.1 hasta 3.2 µg/mL (Line *et al.*, 2008), concentraciones inferiores a las utilizadas en nuestra investigación (0.8 - 4 µg/mL). No obstante se ha reportado en

PAMs de origen animal sintetizados químicamente el uso de concentraciones mayores a las analizadas en esta investigación que van desde 4 hasta >128 mg/L contra bacterias multi drogoresistentes como *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* Methicilin Resistent (MRSA) (Liu *et al.*, 2015). El interés por producir la bacteriocina sintética E-760 por vías recombinantes es latente, ya que se intentó producirla en la levadura *Pichia pastoris* sin embargo la expresión de la proteína heteróloga fracaso ya que el análisis de secuenciación determinó que ninguno de los fragmentos de péptidos obtenidos coincidía con la secuencia de aminoácidos esperada, por lo que sugieren la existencia de bacteriocinas truncadas, la interacción de bacteriocinas con compuestos biológicos desconocidos o procesos de modificación postraduccionales (Arbulu *et al.*, 2015).

#### **7.2. Estrategia 2 y 4. Amplicones *Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO y gBlock conteniendo la secuencia de ambos péptidos.**

Respecto a la estrategia 2 y 4, en los últimos años se ha propuesto al péptido *Mo*-CBP<sub>3</sub> como una alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos con capacidad antifúngica ya que es una proteína altamente termoestable y resistente a cambios de pH que no comprometen su capacidad antifúngica (Freire *et al.*, 2015), además de poseer una eficacia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos importantes a bajas concentraciones siendo tóxico para las células fúngicas pero no para las células humanas. Dicho péptido se compone del 30.3%  $\alpha$ -hélices, 16.3% hojas  $\beta$ , 22.3% de giros y 30.4% formas desordenadas, lo que resulta en una estructura altamente estable. La unión de *Mo*-CBP<sub>3</sub> a la superficie celular fúngica se logra a través de interacciones electrostáticas (Batista *et al.*, 2014), además de que la proteína puede atravesar y dañar la membrana plasmática (Gifoni *et al.*, 2012). Respecto a la especificidad proteica de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, se ha demostrado que contra patógenos cuya pared celular contiene una mayor cantidad de

celulosa como lo es *Pythium oligandrum*, el péptido se mostró inactivo, lo que demuestra la especificidad de esta proteína hacia la quitina (Gifoni *et al.*, 2012). Por otra parte la existencia de homología estructural significativa entre *Mo*-CBP<sub>3</sub> y la estructura proteica 5 DOM presente en la fracción proteica albumina 2S en *Moringa oleifera* (Figura 19) es bastante interesante ya que se ha reportado que proteínas con actividad antifúngica muestran homología significativa con albuminas 2S, lo que sugiere un rol protector de estas proteínas que puede ser asociado con mecanismos de defensa de la propia semilla para evitar ser dañada por algún patógeno de naturaleza fúngica antes de la germinación (Agizzio *et al.*, 2006). A la fecha no se ha reportado la producción del péptido *Mo*-CBP<sub>3</sub> por medios recombinantes por lo que las construcciones que se obtuvieron en este trabajo resultan importantes para seguir trabajando con ellas y poder obtener el péptido purificado y evaluar su actividad.

Por su parte, el péptido FLO se ha reportado como un eficiente agente antibacteriano de naturaleza catiónica, el cual puede inhibir selectivamente a bacterias que potencialmente podrían ser patógenas para los humanos. La funcionalidad de FLO como agente antimicrobiano se debe a dos características estructurales clave: 1). Contiene una carga neta positiva que facilita interacción inicial con membranas microbianas ya que estas tienen una alta densidad de lípidos aniónicos (rasgo característico de las membranas bacterianas, pero no de las eucariotas), por lo que FLO y otros PAMs catiónicos atacan selectivamente las membranas bacterianas y 2). FLO posee un motivo anfifílico compuesto por hélice-bucle-hélice (Figura 21) que permite su interacción y posterior incorporación en las membranas bacterianas (Suarez *et al.*, 2005). Shebek *et al.*, 2015, demostraron que el mecanismo dominante de la actividad antimicrobiana de FLO es la fusión de membranas (interna y externa) utilizando *E. coli* como organismo modelo. Con ayuda de una combinación de técnicas de última generación como la crio-microscopía de transmisión electrónica (cryo-TEM), la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) y la transmisión de luz dinámica (DLS) dilucidaron el mecanismo de fusión de membranas lipídicas en presencia de FLO. Una vez interactuando FLO con dos vesículas compuestas de lípidos aniónicos este se une

rápidamente a las dos vesículas a través de una combinación de interacciones hidrófobas y electrostáticas uniendo las vesículas para maximizar el contacto péptido-lípidos. Una vez que el péptido y las vesículas están en contacto cercano, FLO asume una configuración de "Z" en el punto de contacto entre las dos vesículas, y su primera y segunda hélices crean un puente dentro del cual puede comenzar a formarse un tallo lipídico, conectando las dos vesículas. Este tallo crece hasta el ancho de las vesículas, y la membrana que divide los dos espacios interiores se fusiona con la membrana externa, lo que lleva a la fusión de vesículas. El interés de producir este péptido de forma recombinante se ha visto reflejado en dos investigaciones. Broin *et al.*, 2002, expresaron la proteína MO 2.1 (FLO) en *Escherichia coli* cepa M15Rep4 utilizando el sistema de expresión pQE30, posteriormente la purificaron por medio de cromatografía de afinidad a níquel alcanzando un rendimiento de ~10 mg de proteína purificada recuperada en la fracción soluble a partir de 1 L de cultivo bacteriano, lo cual se considera un rendimiento bastante alto. Evaluaron su actividad floculante con partículas de arcilla y bacterias, reportaron que MO 2.1 es efectiva al formar agregados de partículas de arcilla así como de bacterias como *Pseudomonas brassicacearum* y *Paenibacillus*. Por su parte Suarez *et al.*, 2003, expresaron en *E. coli* el péptido FLO utilizando el plásmido pTYB11 del sistema de expresión IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag), el cual es un mecanismo de expresión y purificación mediado por inteínas que permite purificar por medio de cromatografía de afinidad proteínas recombinantes evitando el uso de proteasas y minimizando las etapas cromatográficas. Las condiciones de inducción de la recombinante fue una concentración de 0.3 mM del inductor IPTG por un periodo de 2 h a 27°C. Referente al rendimiento reportaron 1 mg de FLO recombinante purificado por litro de cultivo bacteriano. La actividad bactericida de FLO fue evaluada contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *L. pneumophila* registrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de entre 0.8 y 5 mg/mL del péptido, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 2 hasta > de 10 mg/mL. Referente al gBlock, las condiciones de inducción de la PR en el vector pET32 fueron de 0.1mM del inductor IPTG por 4 h a 30°C, condiciones diferentes a las utilizadas por Suarez *et al.*, 2003.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A la fecha no se ha reportado ningún estudio sobre la expresión conjunta y funcionalidad de los péptidos *Mo*-CBP<sub>3</sub> y FLO, por lo que la construcción (gBlock/pET32) que se obtuvo en esta investigación resulta interesante para continuar trabajando hasta obtener la proteína recombinante y posteriormente analizar su funcionalidad contra cepas bacterianas.

### **7.3. Estrategia 3. Gen sintético FLOGS en *C. vulgaris***

A la fecha existen reportados trabajos de obtención por vía recombinante del péptido FLO sin embargo estos estudios se han realizado en *E. coli*, por lo que la expresión de este péptido en otro organismo sería particularmente interesante. Actualmente se han desarrollado algunos métodos de transformación de *Chlorella* como lo son las perlas de vidrio, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, transformación con polietilenglicol PEG y la electroporación (Kumar *et al.*, 2018), sin embargo hasta la fecha no existe alguna investigación que mencione la transformación de *C. vulgaris* por medio de biobalística y mucho menos trabajos que reporten la transformación del cloroplasto, lo cual resulta importante ya que en nuestra investigación se lograron obtener transformantes de esta microalga por medio de bombardeo con microproyectiles impregnados con la construcción FLOGS / p464.

La eficiencia de la transformación fue buena obteniendo 25 clonas con el transgen, de las cuales 12 resultaron positivas en la conformación de la presencia de FLOGS en el genoma de la microalga. Las líneas transgénicas generadas con la construcción FLOGS / p464 evidenciaron que el cloroplasto de *C. vulgaris* es un sistema estable en la expresión de proteínas heterólogas. De acuerdo a la cuantificación por ELISA y utilizando el anticuerpo anti-His se determinó que las líneas transgénicas evaluadas produjeron entre el 0.09% y el 0.066% de proteína recombinante en extractos de PTS bajo la acción del promotor *atpA*. Se han reportado rendimientos de expresión de transgenes más elevados



que el nuestro utilizando el mismo casete de expresión (p464) y el mismo método de transformación pero en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Campos-Quevedo *et al.*, (2013) diseñaron y produjeron en el cloroplasto de *C. reinhardtii* una proteína quimérica codificante para varios péptidos bioactivos, utilizaron el casete de expresión p464 que está bajo control del promotor atpA (subunidad alfa de la ATP sintasa) y alcanzaron un rendimiento de entre 0.16 y 1.5 %, que son más elevados que los nuestros. Este bajo rendimiento puede atribuirse a la falta de optimización de codones para la expresión de la proteína recombinante, ya que la secuencia del gen sintético FLOGS fue optimizada en primera instancia para ser traducida por la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* no para *C. vulgaris*. Estudios han reportado aumentos significativos (75 a 80 veces) en la expresión de proteínas recombinantes después de realizar una adecuada optimización de codones (Franklin *et al.*, 2002; Gisby *et al.*, 2011). Referente al análisis funcional del péptido FLOGS producido en *C. vulgaris* no se observó inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, mientras que con ampicilina (0.5 mg/mL) si hubo inhibición contra *S. aureus*, *S. agalactiae* y *K. oxytoca* (Figura 29). El efecto nulo contra las cepas podría deberse a que el método seleccionado para estas pruebas no fue el correcto ya que posiblemente la proteínas no se difundieron de la mejor manera a través del agar. Por lo que se ha considerado plantear otro tipo de pruebas (cuantitativas) para analizar la funcionalidad del péptido recombinante, como lo es la prueba de inactivación *log*.



## 8. CONCLUSIONES

- Se cuenta con 3 genes sintéticos que son E-760, FLOGS y gBlock que mediante análisis bioinformáticos mostraron que son péptidos antimicrobianos.
- Se cuenta con los fragmentos para PAMs de moringa (*Mo*-CBP3 y FLO) los cuales poseen actividad antimicrobiana.
- Es posible transformar el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la secuencia codificante para la bacteriocina E-760 por medio de *Agrobacterium tumefaciens* y analizar la actividad de la proteína recombinante mediante pruebas de inactivación *log*. E-760 demostró una ligera actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.
- Es posible transformar el cloroplasto de *Chlorella vulgaris* con la secuencia codificante para el péptido FLO (sintético) por medio de biobalística, sin embargo, FLO (sintético) no mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, con la metodología empleada.
- Se cuenta con la ligación de los amplicones que contienen los PAMs de moringa en el vector de expresión pET32, sin embargo no se logró la unión de ambos.
- Se cuentan con las condiciones de inducción ideales para la producción de la proteína recombinante gBlock (*Mo*-CBP<sub>3</sub> + FLO) en *E. coli*, las cuales son una concentración de 0.1 mM de IPTG por 4 h de inducción.

## PERSPECTIVAS

Producto de esta investigación se obtuvieron construcciones para la futura expresión, purificación y análisis funcional de los PAMs *Mo*-CBP<sub>3</sub>, FLO, *Mo*-CBP<sub>3</sub> + FLO y FLOGS, así como analizar la capacidad antibacteriana de FLOGS con otro método y otras cepas bacterianas y por ultimo tratar de realizar la unión de los amplicones y verificar si existiera un efecto potenciado por el empalme de ambos fragmentos.

## 9. LITERATURA CITADA.

- Agizzio A. P., Da Cunha M., Carvalho A. O., Oliveira M. A., Ribeiro S. F. F. & Gomes V. M. 2006. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Sci.* 171(4), 515-522.
- Alanis A. F. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era?. *Arch Med Res.* 36: 697-705.
- Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Nilsson B. & Verlander M. 2000. Large-scale synthesis of peptides. *Pept Science.* 55(3), 227-250.
- Anwar F., Ashraf M. & Bhangar M.I. 2005. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *J Am Oil Chem Soc.* 82: 45–51.
- Anwar F. & Bhangar M.I. 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J Agric Food Chem.* 51: 6558–6563.
- Arakawa T., Yu J., Chong D. K. X., Hough J., Engen P. C. & Langridge W. H. R. 1998. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotech.* 16:934-938.
- Arbulu S., Jiménez J. J., Gutierrez L., Cintas L. M., Herranz C. & Hernández P. E. 2015. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *Biomed Res Int.* 2015, 11.
- Bahar A. A., Ren D. 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Bai L.L., Yin W. B., Chen Y.H., Niu L.L., Sun Y. R., Zhao S. M., Yang F. Q., Wang R. C., Wu Q., Zhang X. Q. & Hu Z. M. 2013. A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea*. *PLOS ONE*, 8(1), e54966.
- Bailey T. L., Johnson J. G., Charles E. & Noble W. S. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* 43: W39-W49.
- Barahimipour R., Neupert J. & Bock R. 2016. Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol.* 90:403-418.
- Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N. & Drider D. 2011. Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In Drider, D. & Rebuffat, S. [Eds.] *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer, New York, NY, pp. 171-194
- Baneyx F. 1999. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. En: Moreno-Rueda L. Y. (2010). *Expresión y purificación de las proteínas recombinantes estructurales VP5, VP6 y VP8 del Rotavirus*. Tesis Magister en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia.
- Batista A. B., Oliveira J. T. A., Gifoni J. M., Pereira M. L., Almeida M. G. G., Gomes V. M. & Vasconcelos I. M. 2014. New Insights into the structure and mode of Action of Mo-CBP<sub>3</sub>, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* Seeds. *PLOS ONE*, 9(10), e111427.

- Boman H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 13: 61-92.
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-Anderson B., Robertson D., Klein T. & Shark K. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. En: Fletcher S.P., Muto M. and Mayfield S.P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green Algae. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds). Transgenic microalgae as green cell factories. Springer Sci.
- Broin M., Santaella C., Cuine S., Kokou K., Peltier G. & Joët T. 2002. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. *App Microbiol Biotech.* 60(1-2), 114-119.
- Campos-Quevedo N., Rosales-Mendoza S., Paz-Maldonado L.M.T., Martínez-Salgado L., Guevara-Arauz J.C. & Soria-Guerra R. E. 2013. Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 113:217-225.
- Cao W., Zhou Y., Ma Y., Luo Q. & Wei D. 2005. Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 40:404-410
- Chen Y., Wang Y., Sun Y., Zhang L. & Li W. 2001. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr Genet.* 39:365-370.
- Chlamydomonas Resource Center. Available at: <https://www.chlamycollection.org/>.
- Condon R.G., Schaefer E.J., Santoro M., Longley R.Jr., Tsao Y.S., Zurawski S.M. & Liu Z. 2003. Development of a Chinese hamster ovary cell line for recombinant adenovirus-mediated gene expression. En: Drago-Serrano M. E. and Sainz-Espuñes T. d R. 2006. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev Mex Cienc Farm.* 37(1) 38-44.
- Cotter P. D., Hill C. & Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Micro.* 3(10), 777-788.
- Cotter P. D., Ross R. P. & Hill C. 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Micro*, 11:95-105.
- Day A., Debuchy R., van Dillewijn J., Purton S. & Rochaix J. D. 1990. Studies on the maintenance and expression of cloned DNA fragments in the nuclear genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant.* 78:254-260.
- Díaz-Martínez V. & Martos M. 2010. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes (II). Organismos productores. BiotechSpain. Recuperado el 10/05/2015 de la URL: [https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=expresion\\_proteinas\\_recombinantes\\_ii](https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=expresion_proteinas_recombinantes_ii)
- Dunahay T. G. 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques* 15: 452-460.
- Dunahay T. G., Adler S. A. & Jarvik J. W. 1997. Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers. In Tuan, R. S. [Ed.] Recombinant gene expression protocols. Humana Press Inc., Totawa, NJ, pp. 503-509.

- Ebenhan T., Gheysens O., Kruger H. G., Zeevaart J. R. & Sathekge M. M. 2014. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed Res. Int.* Vol. 2014
- Eckhard L. H., Sol A., Abteu E., Shai Y., Domb A. J., Bachrach G. & Beyth, N. 2014. Biohybrid polymer-antimicrobial peptide medium against *Enterococcus faecalis*. *PLoS one.* 9(10): e109413
- Faizi S., Siddiqui B.S., Saleem R., Aftab K., Shaheen F. & Gilani A.H. 1998. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta Med.* 64(3): 225-228.
- Ferrer-Miralles N., Domingo-Espín J., Corchero J., Vázquez E. & Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.* 8: 17
- Fischer N., Stampacchia O. & Redding K. 1996. Selectable marker recycling in the chloroplast. En: Fletcher S.P., Muto M., Mayfield S.P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green Algae. En: León R., Galván A., Fernández E. (eds). Transgenic microalgae as green cell factories. Springer Sci.
- Franklin S., Ngo B., Efuet E., Mayfield S.P. 2002. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.* 30(6), 733-744.
- Freire J. E. C., Vasconcelos I. M., Moreno F. B. M. B., Batista A. B., Lobo M. D. P., Pereira M. L., Lima J. P. M. S., Almeida R. V. M., Sousa A. J. S., Monteiro-Moreira A. C. O., Oliveira J. T. A. & Grangeiro T. B. 2015. Mo-CBP<sub>3</sub>, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S Albumin Family. *PLoS ONE.* 10(3), e0119871.
- Friend P.J., Hale G. & Chatenoud L. 1999. Phase 1 study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. En: Fletcher S.P., Muto M., Mayfield S.P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green Algae. En: León R., Galván A., Fernández E. (eds). Transgenic microalgae as green cell factories. Springer Sci.
- Friesen J.D. & An G. 1983. Expression vehicles used in recombinant DNA technology. En: Drago-Serrano M. E. and Sainz-Espuñes T. d R. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev Mex Cienc Farm.* 37(1) 38-44.
- Garbus I., Gómez M., Echenique V. 2010. Parte I: Capítulo 4: Herramientas básicas de ingeniería genética. En: Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginske (eds). Biotecnología y mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA.
- Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I. E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J. F. & Rubio-Franchini, I. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of nanostructured materials of titanium dioxide doped with silver and/or copper and their effects on *Arabidopsis thaliana*. *Int J Photoen.* Vol. 2016
- Gassenschmidt U., Jany K. D., Tauscher B. & Niebergall H. 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim Biophys Acta.* 1243(3), 477-481.

- Gasteiger E., Hoogland A., Gattiker S., Duvaud M.R., Wilkins, A. & Bairoch. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (ed), pp 571-607. The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Gifoni J. M., Oliveira J.T.A., Oliveira H. D., Batista A. B., Pereira M.L., Gomes A. S. & Vasconcelos I. M. 2012. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Pept Sci.* 98(4), 406-415.
- Gisby M. F., Mellors P., Madesis P., Ellin M., Lavery H., O’Kane S., Ferguson M. W. J. & Day A. 2011. A synthetic gene increases TGF $\beta$ 3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. *Plant Biotechnol J.* 9(5), 618-628.
- Goldschmidt-Clermont M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. En: Fletcher S.P., Muto M. and Mayfield S.P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green Algae. En: León R., Galván A., Fernández E. (eds). Transgenic microalgae as green cell factories. Springer Sci.
- Gong Y., Hu H., Gao Y., Xu X. & Gao H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38(12), 1879-1890.
- Gorman D. S. & Levine R.P. 1965. Cytochrome F and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1665–1669.
- Grabenhorst E., Schlenke P., Pohl S., Nimtz M. & Conradt H.S. 1999. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. En: Drago-Serrano M. E. and Sainz-Espuñes T. d R. 2006. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev Mex Cienc Farm.* 37(1) 38-44.
- Hammami R., Zouhir A., Ben Hamida J. & Fliss I. 2007. BACTIBASE: a web-accessible database for bacteriocin characterization, *BMC Microbiology* 2007, 7:89.
- Hancock R. E. & Sahl H. G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 24.
- Hassan M., Kjos M., Nes I. F., Diep D. B. & Lotfipour F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 113:723-736.
- Ingham A. B. & Moore R. J. 2007. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol Appl Biochem.* 47: 1–9.
- Janssen M., Tramper J., Mur L. R. & Wijffels R. H. 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol Bioeng.* 81(2), 193-210.
- Jarvis D. L. 2009. Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems. En: Richard R.B. and Murray P.D. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Volume 463:191-222: Academic Press.

- Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P.A. & Ståhl S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 35(2):91- 105.
- Kang S., Kim K-H. & Kim Y-C. 2015. A novel electroporation system for efficient molecular delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* with a 3-dimensional microelectrode. *Sci Rep*. 5:15835
- Kindle, K. L. 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 87:1228-1232
- Kleinberg M. & Mosdell K.W. 2004. Current and future considerations for the new classes of biologicals. En: Drago-Serrano M. E. and Sainz-Espuñes T. d R. 2006. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev Mex Cienc Farm.* 37(1) 38-44.
- Koo J., Park D. & Kim H. 2013. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae*, 28 (4):379-387.
- Koop H. U., Herz S., Golds T. J. & Nickelsen J. 2007. The genetic transformation of plastids. In: Bock, R. [Ed.] Cell and molecular biology of plastids. Topics in Current Genetics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 457-510
- Kumar M., Jeon J., Choi J. & Kim S-R. 2018. Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol*. 30(3), 1735-1745.
- Kumar S. V., Misquitta R. W., Reddy V. S., Rao B. J. & Rajam, M. V. 2004. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci*. 166: 731-738.
- Kyriakou P. K., Ekblad B., Kristiansen P. E. & Kaznessis Y. N. 2016. Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* 1858: 824-835.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157:105-132
- Ladygin, V. G. 2004. Efficient transformation of mutant cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Process Biochem*. 39:1685-1691
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamiable A., Thévenet P., Rey J., Vavrusa M., Derreumaux P. & Tufféry, P. 2016. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res*. 8:W449-54.
- Line J. E., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Levchuk V. P., Svetoch O. E., Seal B.S., Siragusa G. R. & Stern N. J. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 1094-1100.



- Liu C. B., Shan B., Bai H. M., Tang J., Yan L. Z. & Ma Y. B. 2015. Hydrophilic/hydrophobic characters of antimicrobial peptides derived from animals and their effects on multidrug resistant clinical isolates. *Zoo Res.* 36:41-47.
- Liu J. & Chen F. 2016. Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. En: C. Posten & S. Feng Chen (Eds.), *Microalgae Biotechnology* (pp. 1-35). Cham: Springer International Publishing.
- López-Fabal F., Culebras E., Bonilla I., Gómez M. & Picazo J.J. 2008. Actividad *in vitro* de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en Unidad de Cuidados Intensivos. *Rev Esp Quimioter.* 21(3): 189-193.
- López-García B., Moreno A. B., San Segundo B., De los Ríos V., Manning J. M., Gavilanes J. G. & Martínez-del-Pozo A. 2010. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 70:206-210.
- Lüders T., Birkemo G. A., Fimland G., Nissen-Meyer J. & Nes I. F. 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 69:1797-1799.
- Markou G, & Nerantzis E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol Adv.* 31(8), 1532-1542.
- Mayfield S.P., Franklin S.E. & Lerner R.A. 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:438-442.
- Mayfield S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. & Marin-Navarro J. 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech.* 18(2): 126-133.
- Merchant S. S., Prochnik S. E., Vallon O., Harris E. H., Karpowicz S. J., Witman G. B. & Grossman A. R. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-250.
- Mesa-Pereira B., O'Connor P. M., Rea M. C., Cotter P. D., Hill C. & Ross R. P. 2017. Controlled functional expression of the bacteriocins pediocin PA-1 and bactofoencin A in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 7:3069
- Mokoena M. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review (Vol. 22).
- Morton J.F. 1991. The horseradish tree, *Moringa pterigosperma* (Moringaceae). A boon to arid lands. *Econ Bot.* 45: 318–333.
- Mu F. Y., Li H. & Hu Z. L. 2012. Expression of tandem repeat cecropin B in *Chlamydomonas reinhardtii* and its antibacterial effect. *Prog Biochem Biophys.* 39(4): 344~351.
- Mughal M.H., Ali G., Srivastava P.S. & Iqbal M. 1999. Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) – a unique source of food and medicine through tissue culture. *Hamdard Med.* 42: 37–42.
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W. & Goździcka-Józefiak A. 2014. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59:181-196

- Neupert J., Karcher D. & Bock R. 2009. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J.* 57(6), 1140-1150.
- Newman S., Boynton J. E., Gillham N.W., Randolph-Anderson B.L., Johnson A.M. & Harris E.H. 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: Molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* 126: 875-888.
- Nykiforuk C. L., Boothe J. G., Murray E. W., Keon R. G., Goren H. J., Markley N. A. & Moloney M. M. 2006. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol. J.* 4:77-85.
- Nissen-Meyer J. & Nes I. F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch Microbiol.* 167: 67-77
- Nissen-Meyer J., Oppegård C., Rogne P., Haugen H. S. & Kristiansen P. E. 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2:52-60.
- Olson M.E. & Fahey J.W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Rev Mex Biodivers.* 82: 1071-1082.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G. & Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide Class II Bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13:210-219.
- Oyama L. B., Crochet J. A., Edwards J. E., Girdwood S. E., Cookson A. R., Fernandez-Fuentes N. & Huws S. A. 2017. Buwchitin: A ruminal peptide with antimicrobial potential against *Enterococcus faecalis*. *Front Chem.* 5(51).
- Parachin N. S., Mulder K. C., Viana A. A. B., Dias S. C. & Franco O. L. 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38: 446-456.
- Peredelchuk M. & Bennett G. A. 1997. Method for construction of *E. coli* strain with multiple DNA insertions in the chromosome. En: Moreno-Rueda L. Y. (2010). Expresión y purificación de las proteínas recombinantes estructurales VP5, VP6 y VP8 del Rotavirus. Tesis Magister en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez-Juárez F. S. & Soria-Guerra R. E. 2017. Producción del péptido antimicrobiano E-760 en *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Bioprocesos. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. & Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25:1605-12.
- Posmontier B. 2011. The medicinal qualities of *Moringa oleifera*. *Holist Nurs Pract.* 25(2):80-7.
- Pratheesh P. T., Vineetha M. & Kurup G. M. 2014. An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mo. Biotechnol.* 56:507-515.



- Pushparaj B., Pelosi E., Torzillo G. & Materassi R. 1993. Microbial biomass recovery using a synthetic cationic polymer. *Bioresource Technology*, 43: 59-62.
- Ramachandran C., Peter K.V. & Gopalakrishnan P.K. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ Bot.* 34: 276–283.
- Rasala B. A., Muto M., Lee P. A., Jager M., Cardoso R. M. F., Behnke C. A. & Mayfield S. P. 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* 8(6), 719-733.
- Rivera-Solís R. A., Peraza-Echeverría S., Herrera-Valencia V. A. 2011. La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para producción proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*, 62 (4).
- Rojas J., García A. M. & López A. J. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Bol latinoam Caribe plantas med aromát.* 4 (2): 28-32.
- Ruckmani K., Kavimani S., Anandan R. & Jaykar B. 1998. Effect of *Moringa oleifera* Lam. on paracetamol-induced hepatotoxicity. *Indian J Pharm Sci.* 60(1): 33–35.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1626 pp.
- Santana H., Martínez E., Sánchez J. C., Moya G., Sosa R. & Hardy E. 1999. Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biotechnol Apl.* 16(3):154-9
- Shebek K., Schantz A. B., Sines I., Lauser K., Velegol S. & Kumar M. 2015. The Flocculating Cationic Polypeptide from *Moringa oleifera* Seeds Damages Bacterial Cell Membranes by Causing Membrane Fusion. *Langmuir.* 31(15), 4496-4502.
- Shin W. S., Lee B., Kang N. K., Kim Y. U., Jeong W. J., Kwon J. & Chang Y. K. 2017. Complementation of a mutation in CpSRP43 causing partial truncation of light-harvesting chlorophyll antenna in *Chlorella vulgaris*. *Sci Rep.* 7(1), 17929.
- Siddhuraju P. & Becker K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam) leaves. *J Agric Food Chem.* 51(8): 2144-2155.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J, Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. & Higgins D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 7: 539
- Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S. & Singh T. P. 2013. Antimicrobial Lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *Int J Pept.* 12.
- Simmons L.C., Reilly D. & Klimowski L. 2002. Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: Rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. En: Fletcher S.P., Muto M. and Mayfield

- S.P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green Algae. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds.) Transgenic microalgae as green cell factories. Springer Sci.
- Suarez M., Entenza J. M., Doerries C., Meyer E., Bourquin L., Sutherland J., Marison I., Moreillon P. & Mermod N. 2003. Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol Bioeng.* 81(1), 13-20.
- Suarez M., Haenni M., Canarelli S., Fisch F., Chodanowski P., Servis C., Michielin O., Freitag R., Moreillon P. & Mermod N. 2005. Structure-function characterization and optimization of a plant-derived antibacterial peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(9), 3847-3857.
- Sørensen H.P. & Mortensen K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 115(2), 113-128.
- Sun M., Qian K., Su N., Chang H., Liu J. & Chen G. 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. En: Mayfield S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. and Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech.* 18(2): 126-133.
- The UniProt Consortium. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. 2017. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=family:%22bacteriocin+class+IIB+family%22> (last accessed, 13 september 2017)
- Thomas P. & Smart T.G. 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. En: Drago-Serrano M. E. and Sainz-Espuñes T. d R. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev Mex Cienc Farm.* 37(1) 38-44.
- Tillotson G. S. & Theriault N. 2013. New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. F1000Prime Rep. 5
- Wang G. 2015. Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1268, 43-66.
- Wang, K., Drayton, P., Frame, B., Dunwell, J. & Thompson, J. 1995. Whisker-mediated plant transformation: An alternative technology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 31: 101-104.
- Wang Q., Zhu F., Xin Y., Liu J., Luo L. & Yin Z. 2011. Expression and purification of antimicrobial peptide buforin IIb in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 33: 2121-2126
- Wieprecht T., Dathe M., Beyermann M., Krause E., Maloy W. L., MacDonald D. L. & Bienert M. 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochem.* 36:6124-6132.
- Woraprayote W., Malila Y., Sorapukdee S., Swetwathana A., Benjakul S. & Visessanguan W. 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci.* 120: 118-132

- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en> (last accessed 23 August 2017).
- Xie B., Bishop S., Stessman D., Wright D., Spalding M. H. & Halverson L. J. 2013. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B(12)-producing bacteria. *ISME J.* 7:1544-1555.
- Xu X., Jin F., Yu X., Ji S., Wang J., Cheng H., Wang C. & Zhang W. 2007. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 53:293-301
- Yang B., Liu J., Jiang Y. & Chen F. 2016. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective. *Biotechnol J.* 11(10), 1244-1261.
- Yang S., Lin C., Sung T., & Fang, J. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology.* 5, 241.
- Yang Z., Li Y., Chen F., Li D., Zhang Z., Liu Y., Zheng D., Wang Y., and Shen G. 2006. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. En: Mayfield S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. and Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech.* 18(2): 126-133.
- Zakharchenko N. S., Buryanov Y. I., Lebedeva A. A., Pigoleva S. V., Vetoshkina D. V., Loktyushov E. V., Chepurnova V.D., Kreslavski A. A. & Kosobryukhov, A. A. 2013. Physiological features of rapeseed plants expressing the gene for an antimicrobial peptide cecropin P1. *Russ. J. Plant Physiol.* 60:411-419.
- Zhang G. G., Rodrigues L., Rovinski B. & White K. A. 2002. Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mo. Biotechnol.* 20:131-136.
- Zhang Y.K., Shen G.F. & Ru B.G. 2006. Survival of human metallothionein-2 transplastomic *Chlamydomonas reinhardtii* to ultraviolet B exposure. En: Mayfield S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. and Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech.* 18(2): 126-133.
- Zhao X., Wu H., Lu H., Li G. & Huang Q. 2013. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* 8: e66557