

PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Ornelas Gutiérrez Gloria de la Luz (1), Ávila Muro Eva Edilia (2)

1 [Licenciatura en Biología experimental, Universidad de Guanajuato] | [gdll.ornelasgutierrez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Guanajuato, Universidad de Guanajuato]
| [edilia@ugto.mx]

Resumen

La inmunidad innata es la primera línea de defensa ante la llegada de un patógeno, es inmediata y de baja especificidad. Intervienen células como, neutrófilos y macrófagos; que participan mediante la secreción de moléculas como citocinas, que modulan la respuesta inmune, y quimiocinas que atraen más células al sitio de la infección. Las células epiteliales, los neutrófilos y macrófagos secretan péptidos antimicrobianos que tienen un carácter anfipático y son de tamaño no mayor a 100 aminoácidos. En este estudio, se aislaron neutrófilos mediante un gradiente de densidad, a partir de sangre periférica de donadores voluntarios sanos. Los neutrófilos se estimularon con acetato de forbol miristato (PMA), para inducir la formación de trampas extracelulares (NETs). Éstas son fibras de DNA descondensado asociado a proteínas nucleares como histonas y a péptidos antimicrobianos derivados de los gránulos de los neutrófilos. El objetivo de este estudio fue separar los péptidos catiónicos de las NETs para su posterior análisis. Para ello se empleó una columna de intercambio iónico, y la fracción de péptidos se analizó por electroforesis. Se estandarizaron las condiciones para aislar los péptidos antimicrobianos presentes en trampas extracelulares de neutrófilos para posteriormente identificarlos empleando anticuerpos específicos.

Abstract

Innate immunity is the first line of defense against pathogens, it is immediate and of low specificity. Cells such as neutrophils and macrophages are involved with the secretion of molecules such as cytokines, which modulate the immune response, and chemokines that attract more cells to the site of infection. Epithelial cells, neutrophils and macrophages secrete antimicrobial peptides that are amphipathic and are no larger than 100 amino acids in size. In this study, neutrophils were isolated by a density gradient from peripheral blood from healthy volunteer donors. Neutrophils were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA), to induce the formation of extracellular traps. These are decondensed DNA fibers associated with nuclear proteins such as histones and antimicrobial peptides derived from neutrophil granules (NETs). The aim of this study was to separate the cationic peptides from the NETs for further analysis. For this purpose, an ion exchange column was used, and the peptide fraction was analyzed by electrophoresis. The conditions were standardized to isolate the antimicrobial peptides present in extracellular neutrophil traps for their identification using specific antibodies.

PALABRAS CLAVE

Neutrófilos; Péptidos antimicrobianos; LL-37; Inmunidad innata; hCAP18.

INTRODUCCIÓN

Inmunidad innata

- *Péptidos antimicrobianos*

La defensa activa del organismo se lleva a cabo a través de la respuesta inmune, la cual puede realizarse de dos formas distintas pero relacionadas: la respuesta innata y la respuesta adaptativa.

La respuesta inmune innata interviene de manera inmediata, como primera línea de defensa inmune, frente a una gran variedad de agresiones. No requiere de un contacto previo con el patógeno y en ella intervienen diversas moléculas tales como el complemento, citocinas, así como un conjunto de células, entre las que destacan los neutrófilos y los monocitos [1].

En particular, los péptidos antimicrobianos juegan un rol importante en la inmunidad innata tanto en la piel como en mucosas; son moléculas anfipáticas de no más de 100 aa con carácter catiónico e hidrofóbico [2], lo que les permite ser solubles en ambientes acuosos, pero también interaccionar con membranas lipídicas y son capaces de desestabilizarlas [3].

Éstos péptidos se almacenan en los gránulos de los neutrófilos, que al migrar al sitio de infección, en una respuesta innata liberarían sus gránulos citoplásmicos para dañar al patógeno.

Catelicidina LL-37

Los péptidos catiónicos se dividen en dos familias, las defensinas y las catelicidinas. Dentro de esta última se encuentra el LL-37, que se conforma de 37 residuos de aminoácidos, es de carácter anfipático y se encuentra en leucocitos, tales como monocitos, neutrófilos, células T, células NK y células B [4]. Tanto su precursor, hCAP18, como el LL-37 se almacenan en gránulos y éste último a su vez sufre escisión proteolítica para generar péptidos de diferente tamaño durante su activación [4].

Estudios recientes demuestran que la fragmentación de LL-37 ocurre después de la degranulación [5].

El presente proyecto consistió en aislar péptidos antimicrobianos de trampas extracelulares de neutrófilos obtenidos de sangre periférica de humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se formó un gradiente de densidad con 6 ml sangre fresca sobre 3 ml de histopaque 1017, fase intermedia, y 3 ml de histopaque 1119 como la fase del fondo. Se sometió a centrifugación a 2200 rpm, durante 30 minutos y al término se recuperó la fase de granulocitos; mismos que fueron lavados con PBS estéril mediante centrifugación y resuspendidos en medio de cultivo RPMI con albúmina sérica humana al 2% (HSA) a razón de 2 millones de células por ml.

Usando una placa de 24 pozos se incubaron en cada uno de ellos 2×10^5 células en 500 μ l de medio RPMI-HSA 2%, durante 1h en atmósfera de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, se agregó a cada pozo 1 μ l de PMA 480 nM y se permitió la generación de trampas durante 3 h.

Las trampas fueron cortadas por 2U/ml de nucleasa micrococcal, durante 1h a 37°C, luego se colectó el sobrenadante.

A partir del sobrenadante obtenido, se purificaron los péptidos antimicrobianos mediante una resina de Sulfopropil-Sephadex. Se lavó la resina para llevarla a pH 4.5 con un buffer de citratos 20 mM, se añadió el sobrenadante de las NETs y se incubaron con la resina durante 1h a 4°C, en agitación. Posteriormente, se lavó con el mismo buffer hasta no detectar DO a 280 nm en la elución. Se sometió a un cambio de pH para recuperar los péptidos catiónicos, con NaOH 0.2 M, neutralizando cada fracción obtenida con HCL 0.8 M.

Se concentraron las muestras mediante liofilización para ser analizadas en un gel de poliacrilamida al 14%, donde se corrieron durante 2 horas a 100 V, luego se realizó tinción con plata para evidenciar las bandas. Se usaron como marcadores: Standards, Broad Range, catálogo #161-0317.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se indujeron las trampas extracelulares de neutrófilos, tal como se indica en la metodología,

luego se observaron en el microscopio confocal (Figura 1), junto con su respectivo control sin inductor (Figura 2); empleando el colorante Hoechst 33342. Dichas fibras extracelulares se componen de un esqueleto de DNA y numerosas enzimas proteínas y péptidos antimicrobianos provenientes de los gránulos citoplásmicos [6].

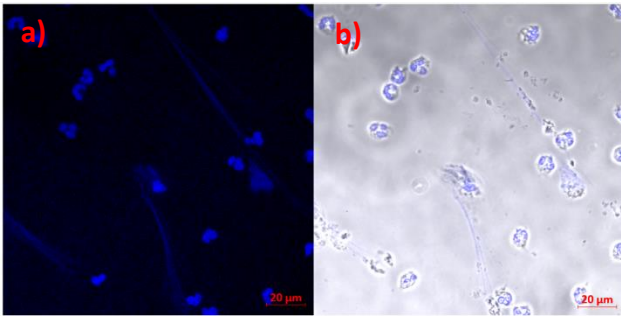


FIGURA 1: Control para la formación de NETs, a) evidencia el DNA mediante fluorescencia, tanto dentro como fuera de las células y b) es la sobreposición de la imagen a) y la de campo claro.

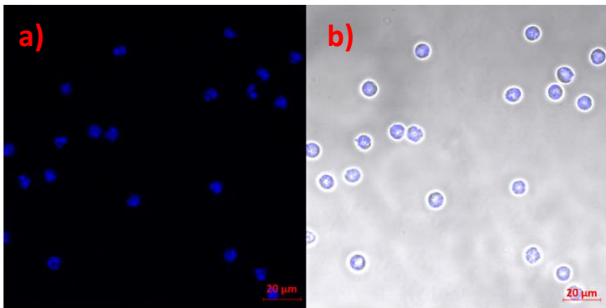


FIGURA 2: Control sin inductor de trampas. a) Se pueden ver los núcleos celulares bien definidos, lo que significa que no hubo liberación del DNA. b) es la sobreposición de la imagen a) y la de campo claro que permite ver el contorno celular.

Después de hacer evidente la liberación de los componentes celulares de los neutrófilos, donde se encuentran los péptidos antimicrobianos, objeto del presente estudio, se debió escindir el principal componente de las fibras, como lo es el DNA, usando un método enzimático; para luego purificar las proteínas por intercambio iónico y analizarlas en un gel de poliacrilamida (Figura 3).

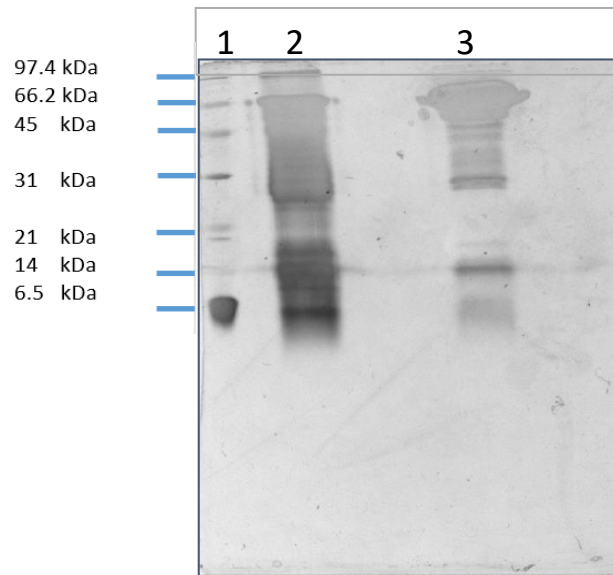


FIGURA 3: Gel de poliacrilamida al 14%, el carril uno muestra los marcadores de peso molecular (Standards, Broad Range, catálogo #161-0317), el carril número 2 contiene la muestra después de haber sido purificada (Péptidos Catiónicos) y el carril 3 corresponde a la fracción de proteínas que no interaccionaron con la resina durante la purificación.

Es evidente la presencia de albúmina, en aproximadamente 67 kDa, ya que es un componente del medio de inducción de las NET's. Sin embargo, la muestra que ha sido eluida de las perlas aniónicas (Péptidos Catiónicos) contiene menos albúmina.

Es importante destacar el abundante bandeo, por debajo de los 21 KdDa, que muestran los Péptidos Catiónicos, en comparación con la muestra que no interaccionó con la resina. Éstas bandas posiblemente representan variantes de los péptidos antimicrobianos, que pueden ser desde los precursores, hasta los péptidos activos.

La banda de menor peso molecular, ubicada en aproximadamente 5 kDa, según el peso, se aproxima al del LL-37, dado que se ubica por debajo del último marcador, 6.5 kDa.

CONCLUSIONES

Se enriqueció la fracción de péptidos catiónicos a partir de trampas extracelulares de neutrófilos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Eva E. Ávila Muro por darme la oportunidad de ser parte del proyecto y aprender de su experiencia; además de proveer los recursos para la experimentación.

Se agradece, en particular, a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional para fortalecer la excelencia académica, convenio 017/2016.

REFERENCIAS

[1] Markus Reinholz, Thomas Ruzicka, Jürgen Schaubert. Cathelicidin LL-37: An Antimicrobial Peptide with a Role in Inflammatory Skin Disease. *Ann Dermatol* (2012); 24:126-135.

[2] Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol* (2012); 32:143-171.

[3] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* (2003); 55:27-55.

[4] Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys* (2006);1758(9):1408-25.

[5] Biswaranjan Pradhan, Dipanjan Guha, Krushna Chandra Murmu, Abhinav Sur, Pratikshya Ray, Debashmita Das and Palok Aich. Comparative efficacy analysis of anti-microbial peptides, LL-37 and indolicidin upon conjugation with CNT, in human monocytes. *Journal of Nanobiotechnology* (2017); 15:1-44.

[6] Ole E. Sørensen, Per Follin, Anders H. Johnsen, Jero Calafat, G. Sandra Tjabringa, Pieter S. Hiemstra and Niels Borregaard: Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* (2001) 97:3951-3959.