



TESINA DE GRADO Licenciatura en Bioquímica Facultad
de Ciencias Universidad de la República Montevideo
2016

Expresión heteróloga de una defensina de ceibo y evaluación de actividad antimicrobiana del péptido recombinante

Br. María Alejandra Borba

Tutora: Dra. Gianna Cecchetto

Co-tutora: Mag. Susana Rodríguez

Laboratorio de Microbiología Molecular Microbiología – IQB
Facultad de Ciencias – Facultad de Química

Resumen

Los péptidos antimicrobianos (AMPs-*antimicrobial peptides*) desempeñan un rol fundamental en la formación de barreras de defensa de los organismos multicelulares, contra una amplia variedad de patógenos. Las plantas son importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos como los AMPs de las clases defensinas, esnaquinas, tioninas y ciclótidos. El uso de AMPs vegetales puede resultar útil para el control de plagas en la agricultura, lo que permitiría asegurar la cosecha, mejorar rendimientos y aumentar la vida útil poscosecha. Además, por presentar actividad contra patógenos humanos están siendo considerados entre las moléculas más prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos con acciones antibióticas y anti-inflamatorias. Por estos motivos se justifica la investigación de este tipo de moléculas a partir de fuentes naturales con alta diversidad genética pero aún muy poco exploradas como son las plantas nativas. El método más utilizado para la producción de AMPs a mediana y gran escala es la expresión heteróloga por su alto rendimiento y bajo costo. Con el objetivo identificar nuevos antimicrobianos, este trabajo plantea producir de forma recombinante un AMP de tipo defensina (EcgDf1) de una especie vegetal nativa de nuestro país para su posterior evaluación frente a diversos patógenos.

El gen y ARNm de EcgDf1 fueron previamente aislados, en nuestro laboratorio, a partir de brotes de Ceibo. La secuencia de ADNc correspondiente al péptido maduro fue subclonada en el vector de expresión pET102 utilizando RF-cloning. Se trabajó con dos cepas de expresión *E. coli* BL21 y Rosetta-gami (Rg), previo a la transformación en las mismas se confirmó secuencia y marco de lectura adecuado mediante secuenciación. Se evaluaron distintas condiciones de crecimiento (temperaturas y tiempos post-inducción) en ambas cepas, para las cuales siempre se logró obtener el péptido recombinante en la fracción soluble, obteniéndose un mayor rendimiento del péptido de fusión en la fracción soluble con la cepa Rg a 28°C y 24 horas post-inducción. Además se realizó la puesta a punto de la etapa de clivado del péptido de fusión y purificación de la defensina por cromatografía de afinidad confirmando la presencia de la misma por geles de poliacrilamida y espectrometría de masa (MALDI-TOF). Se llevaron a cabo ensayos de actividad antimicrobiana MIC (mínima concentración inhibitoria) con el péptido recombinante frente a bacterias gram positivas, gram negativas, y hongos filamentosos patógenos de plantas y humanos. Los resultados de los mismos revelaron una considerable actividad biológica contra patógenos de importancia agronómica como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* que infecta al tomate, *Aspergillus niger*, patógeno de cebolla y patógeno oportunista en humanos y *Botrytis cinérea* patógeno importante de la uva. Mientras que para los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas versicatoria* y *Penicillium expansum* no mostró actividad inhibitoria a las concentraciones ensayadas. Los resultados obtenidos permitieron avanzar hacia la caracterización de EcgDf, AMP vegetal de tipo defensina.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Presentación de los péptidos antimicrobianos	1
1.2	Mecanismos de defensa de las plantas	3
1.3	Diversidad de los péptidos antimicrobianos	4
1.4	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.....	5
1.5	Defensinas de plantas	9
1.6	Producción de defensinas vegetales – expresión heteróloga.....	12
2	Objetivos.....	14
2.1	Objetivo general	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	Resultados y Discusión.....	15
3.1	Subclonado defensina de ceibo (EcgDf1)	15
3.2	Producción defensina recombinante	19
3.3	Purificación del péptido recombinante	22
3.4	Clivaje de proteína de fusión y purificación	25
3.4.1	Digestion y purificación del péptido recombinante Trx-EcgD1-His6 en solución (E1).....	27
3.4.2	Digestión y purificación del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en columna (E2)	29
3.5	Cuantificación péptido recombínate.....	35
3.6	Ensayos de actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	37
3.6.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	39
3.6.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Aspergillus niger</i>	41
3.6.3	Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Botrytis cinerea</i>	44
4	Conclusiones	46
5	Perspectivas	47
6	Materiales y Métodos.....	49
6.1	Materiales	49
6.1.1	Medios de cultivo	49
6.1.2	Cepas	50
6.1.3	Vectores	50
6.1.4	<i>Primers</i>	51

6.2	Métodos.....	51
6.2.1	Técnicas empleadas con ADN.....	51
	Obtención <i>megaprimer</i> (Primera RF PCR).....	51
	Amplificación de ADN EcgDf1-pET102 (Segunda RF PCR).....	52
	Digestión con DpnI	52
	Precipitación con ARN-t del plásmido sintetizado por <i>RF-cloning</i>	52
	Transformación de células de <i>E.coli</i> mediante electroporación.....	52
	Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría (nanodrop).....	54
6.2.2	Técnicas empleadas con proteínas	56
6.2.3	Cuantificación proteica por método de Bradford	59
6.2.4	Determinación de masa de péptidos.....	59
6.2.5	Ensayos de actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> : MIC	60
7	Referencias bibliográficas	61

1 Introducción

1.1 Presentación de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (*AMPs-antimicrobial peptides*) son armas de defensa antiguas del sistema inmune innato que han sido conservadas a lo largo de la evolución de la mayoría de los organismos vivos. Su amplia distribución a través de los reinos animal y vegetal sugiere que han cumplido un rol fundamental en la exitosa prevalencia de los organismos multicelulares complejos. A pesar de su antiguo linaje, estos péptidos han permanecido como elementos de defensa eficaces, contra una amplia variedad de patógenos incluyendo bacterias, hongos, virus y protozoarios (Boman, 1995; Zasloff, 2002).

Los AMPs se caracterizan por su pequeño tamaño, formados por menos de 200 aminoácidos de longitud, con un peso molecular inferior a 10 KDa, codificados por un único gen. Todos los péptidos antimicrobianos derivan a partir de precursores más grandes con un pre-dominio N-terminal que incluye una secuencia señal. Las modificaciones post-traduccionales incluyen procesamiento proteolítico y en algunos casos glicosilación amidación carboxi-terminal, isomerización de aminoácidos, y halogenación (Zasloff, 2002; Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Poseen una carga neta positiva, tolerancia a los disolventes orgánicos, son termoestables y cumplen con una amplia gama de actividades biológicas, con énfasis en actividades antimicrobianas (van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008). El principio estructural fundamental que subyace en todas las clases de AMPs es la capacidad de la molécula para adoptar una forma en la que los grupos de aminoácidos hidrófobos y catiónicos están organizados espacialmente dando un diseño anfipático (Figura 1). Esto se debe a un exceso de residuos cargados positivamente, tales como arginina y lisina (Zasloff, 2002; Giuliani *et al.*, 2007). La tendencia a formar este tipo de estructuras facilita su interacción e inserción en las paredes celulares y membranas de fosfolípidos aniónicos de los microorganismos (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

En los mamíferos, incluidos los humanos, los péptidos antimicrobianos son particularmente abundantes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos donde son almacenadas y secretadas luego de la activación celular resultante de la interacción de receptores y sus ligandos específicos, así como también en células epiteliales especializadas, en las que se expresan constitutivamente y también de forma inducida por infecciones, ambos contribuyendo al control de patógenos (Klotman & Chang, 2006). Además de los efectos directos sobre los patógenos, tienen efectos sobre células de la respuesta inmune

potenciando otros mecanismos efectores. En las plantas este tipo de moléculas se secretan en la mayoría, si no en todas las especies vegetales, y se encuentran constitutivamente en órganos de almacenamiento (es decir, semillas) y en las capas de células periféricas de tejidos generativos (órganos reproductivos, frutas y flores), además de ser inducidos en los tejidos vegetativos, después de la infección (Ganz, 2004; Carvalho & Gomes, 2009; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

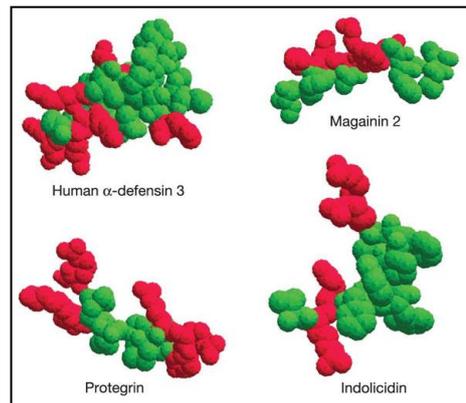


Figura 1. Ejemplos del diseño antipático de los péptidos antimicrobianos. En rojo se muestran los aminoácidos catiónicos y en verde los aminoácidos hidrofóbicos. Extraído de Zasloff, Nature, 2002.

Los AMPs vegetales pueden ser útiles para mejorar los rendimientos de plantas agrícolas. Estos presentan una amplia gama de actividades inhibitoras contra microorganismos fitopatógenos (principalmente hongos), y ya se han utilizado para mejorar la resistencia de los cultivos ante los ataques de patógenos a través de la manipulación transgénica (Terras *et al.* 1995). También pueden ser útiles en la tolerancia al estrés abiótico, como se ha demostrado en las plantas transgénicas utilizando diferentes clases péptidos, estableciéndolos como importantes objetivos de la biotecnología agrícola (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Es bien conocido que especialmente entre los cultivos de alimentos, los patógenos de plantas tienen un considerable impacto económico, al provocar enfermedades en las mismas que determinan pérdidas significativas o disminuciones en la calidad y seguridad de los productos agrícolas.

1.2 Mecanismos de defensa de las plantas

Las armas de defensa de las plantas incluyen barreras morfológicas, metabolitos secundarios y proteínas antimicrobianas, que en combinación obstaculizan la invasión de patógenos. Innumerables ensayos de expresión han demostrado, en la última década, que una sola interacción planta/patógeno (compatible o incompatible) es capaz de reclutar o silenciar a cientos de genes, muchos de función conocida, mientras que otros quedan por ser descritos (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Después del contacto con el agente infeccioso y la activación del sistema de defensa específico, se inicia una serie de respuestas secundarias, incluyendo el refuerzo de las paredes celulares, la producción de antibióticos de plantas (fitoalexinas) y la síntesis de proteínas de defensa denominadas proteínas PR (*Pathogenesis Related*). Estas últimas reaccionan contra muchas clases de agentes patógenos, incluyendo hongos, bacterias, virus o incluso insectos. La resistencia y la susceptibilidad no dependen sólo de la "calidad" de los genes de defensa activados, sino también de la expresión simultánea de diferentes conjuntos de genes (van Loon *et al.*, 2006, De-Paula *et al.*, 2008, Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Las proteínas PR de defensa han sido clasificadas en 17 familias. La mayoría son inducidas a través de la acción de compuestos de señalización como el ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno, y poseen acción/efecto antimicrobiana/o *in vitro* a través de actividades líticas en las paredes celulares, toxicidad de contacto y tal vez una implicación en la señalización defensiva (van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008). Entre los diferentes grupos de PR, tres de ellos consisten en proteínas de bajo tamaño molecular con características comunes a los péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas. Hay varias clases de estos péptidos, incluidos defensinas vegetales, esnaquinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, proteínas similares a heveína, las de tipo notina, y los péptidos circulares conocidas como ciclótidos (Revisado por Benko-Iseppon *et al.*, 2010). En las plantas, además de actuar localmente en los sitios de infección, estos AMPs también se acumulan en los sitios no infectados, un fenómeno conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR). En general, mientras que este tipo de moléculas se expresan en varios tejidos, están mejor representados en los que están en contacto constante con el ambiente externo y por lo tanto expuestos continuamente a la microbiota (De-Paula *et al.*, 2008, Benko-Iseppon *et al.*, 2010, de Beer & Vivier, 2011). Los péptidos antimicrobianos pueden ser sintetizados rápidamente después de la infección, debido a que son solamente producidos por transcripción y traducción de un solo gen, con un costo de energía comparativamente más bajo que los que se emplean en el sistema inmune adaptativo de

vertebrados superiores o la producción de metabolitos secundarios resultantes de las vías metabólicas complejas. Aunque la respuesta inmune innata de las plantas ha sido considerada como una defensa primordial sistémica, es capaz de mostrar actividad diferencial contra diferentes tipos de microorganismos (Thomma *et al.* 2001; Zasloff, 2002; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

1.3 Diversidad de los péptidos antimicrobianos

La variedad de péptidos antimicrobianos descubierta es tan grande que es difícil categorizarlos excepto en términos generales en base de su estructura secundaria, según su disposición y conectividad de residuos de cisteína. Los miembros de una misma familia muestran un patrón de plegado globalmente comparable, la adopción de una estructura tridimensional que implica la formación de elementos estructurales secundarios tales como hojas beta y alfa hélices que se estabilizan por puentes disulfuro intramoleculares (van't Hof *et al.*, 2001; Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Básicamente los AMPs se pueden clasificar en cinco categorías principales: hoja beta, alfa hélice, mezcla de estructuras alfa hélice y hoja beta, cíclicos y péptidos extendidos (Figura 2). Las dos primeras clases son las más comunes en la naturaleza (Hancock & Lehrer, 1998; Peters *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Una vasta colección de AMPs aislados a partir de una amplia gama de organismos se puede encontrar en la base de datos de péptidos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/main.php>). La gran diversidad a nivel de secuencias peptídicas, a pesar de su pequeño tamaño y estructura terciaria altamente conservada explicaría la amplia gama de microorganismos sobre los que actúan y la diversidad de modos de acción que poseen estos péptidos antimicrobianos (Silva *et al.*, 2011; Thevissen *et al.*, 2012; van der Weerden *et al.*, 2010 y 2013; De Coninck *et al.*, 2013; Sagaram *et al.*, 2013; Poon *et al.*, 2014; Vriens *et al.*, 2014; Payne *et al.*, 2016; El-Mounadi *et al.*, 2016).

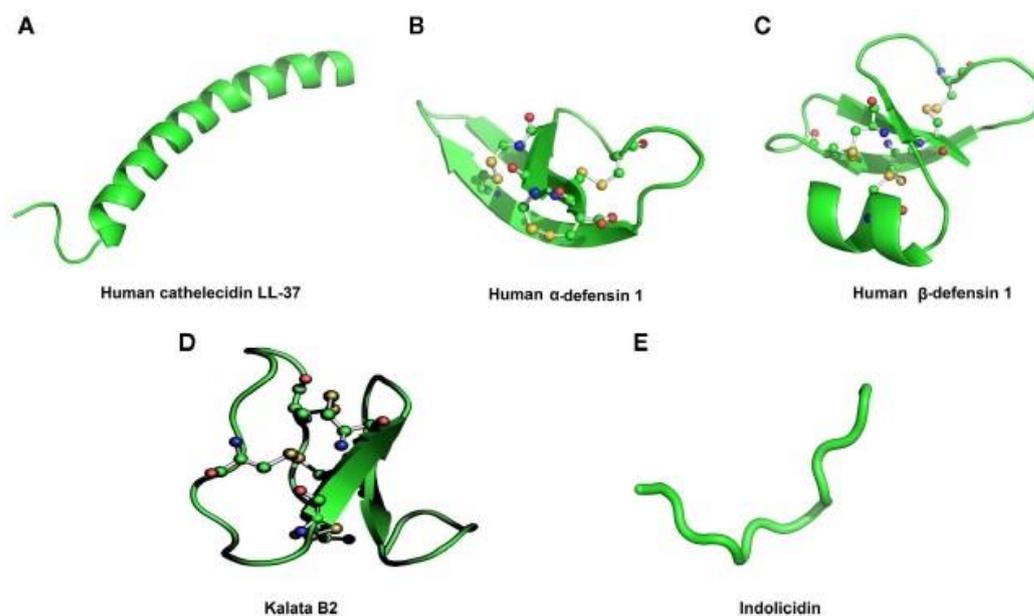


Figura 2. Modelos estructurales de las cinco clases de péptidos antimicrobianos. (A) Péptidos α -hélice; (B) péptidos compuestos por series de hojas β ; (C) mezcla de estructuras de α -hélices / hojas β ; (D) péptidos cíclicos y (E) péptidos que adoptan estructuras no convencionales, tales como hélices extendidas. Los enlaces disulfuro están representados en barras y esferas. Extraído de Silva *et al.*, 2011.

1.4 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

Las membranas bacterianas se organizan de tal manera que la superficie más externa de la bicapa, la expuesta al mundo exterior, está fuertemente poblada por lípidos cargados negativamente. En contraste, la superficie exterior de las membranas de plantas y animales se compone principalmente de lípidos sin carga; la mayoría de los lípidos con grupos con carga negativa son localizados hacia la capa interior, frente al citoplasma (Matsuzaki, 1999). Este antiguo “talón de Aquiles” en el diseño de las membranas celulares microbianas, permite distinguir las del resto, siendo aprovechado como blanco de acción por los péptidos antimicrobianos (Figura 3) (Zasloff, 2002). Además estos péptidos tienen la capacidad de unirse a la quitina y polisacáridos que se encuentran presentes en muchos hongos patógenos. A pesar de su gran diversidad, la mayoría de AMPs actúan a través de un mecanismo que implica la destrucción de la membrana microbiana y la formación de poros, permitiendo el flujo de salida de iones y nutrientes esenciales (Peters *et al.*, 2010).

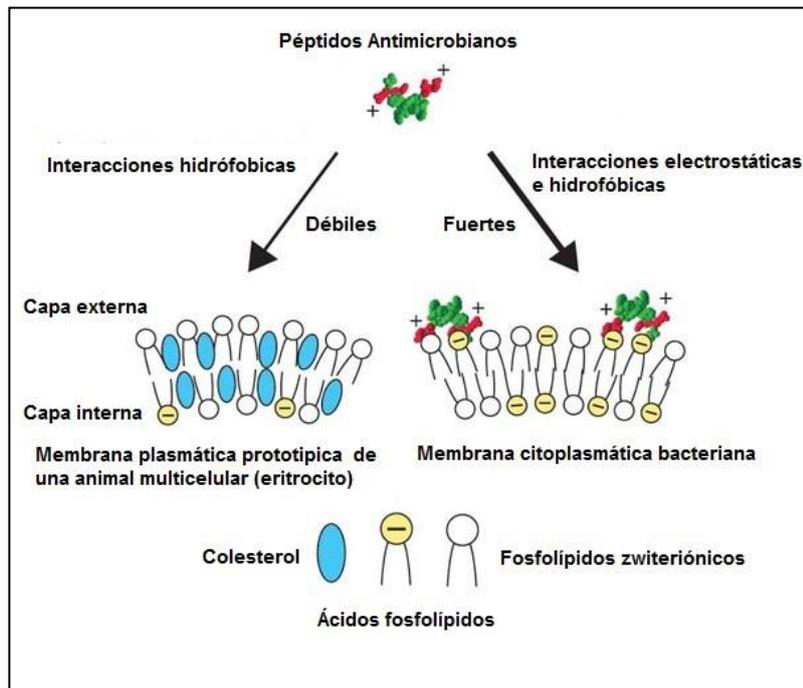


Figura 3. Selectividad celular. Su diseño anfipático determina su especificidad y mecanismo de acción. Extraído de Zasloff, Nature, 2002.

Aunque los mecanismos por los cuales los AMPs se asocian y permeabilizan las membranas celulares microbianas no son del todo claros, el modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (SMH), actualmente el más aceptado, propone la interacción del péptido con la membrana, seguido por el desplazamiento de los lípidos, la alteración de la estructura de la membrana, y en ciertos casos la entrada del péptido en el interior de la célula diana (Figura 4) (Zasloff, 2002). El mecanismo molecular y la vía de permeación de membrana pueden variar según el péptido en función de una serie de parámetros tales como la secuencia de aminoácidos, la composición de lípidos de membrana y la concentración de péptido. La presencia de colesterol en la membrana diana reduce en general la actividad de los péptidos antimicrobianos, ya sea debido a la estabilización de la bicapa lipídica o a interacciones entre el colesterol y el péptido. El aumento de la fuerza iónica generalmente reduce la actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos debido al debilitamiento de las interacciones electrostáticas que son necesarias para la interacción inicial entre el péptido y el microorganismo (Matsuzaki, 1999; Shai, 2008).

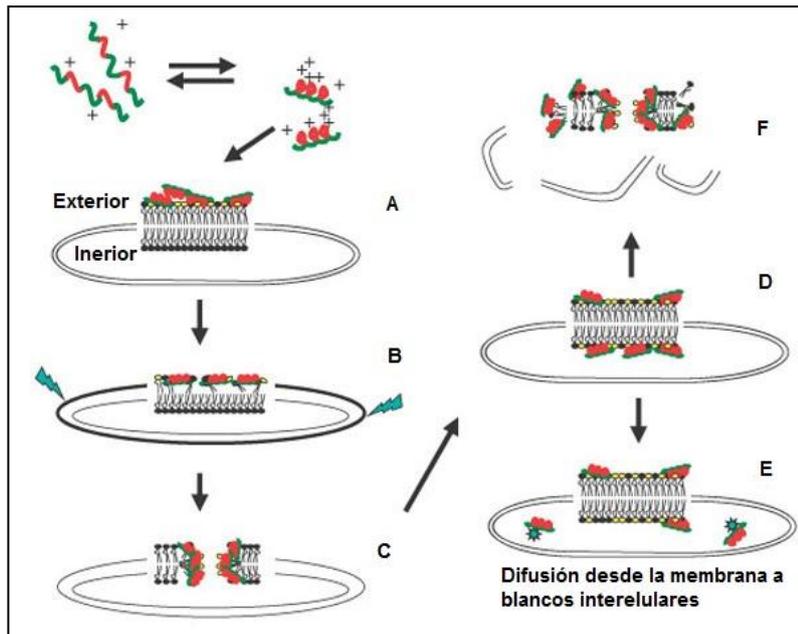


Figura 4. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang para el mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos. (A) Reconocimiento de la membrana bacteriana. (B) Inserción a la membrana mediada por atracción electrostática. (C) Formación de poros en la membrana. (D) Transporte de péptidos y lípidos a la capa interna de la membrana. (E) Acción de los péptidos sobre blancos intracelulares. (F) Colapso de la membrana bacteriana y ruptura de la célula. En negro se indican los lípidos cargados negativamente. Extraído de Zasloff Nature, 2002.

Además se han evidenciado mecanismos adicionales o complementarios de cómo los péptidos antimicrobianos destruyen a los microorganismos. La interacción inicial entre estos péptidos catiónicos y la membrana celular microbiana les permitiría penetrar en la célula para unirse a las moléculas intracelulares, dando como resultado la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, la síntesis de ADN, ARN y proteínas, entre otros (Figura 5). Esto ha llevado a sugerir que la interrupción de la membrana por sí misma no es la causa primordial de la actividad antimicrobiana de muchos de estos péptidos, sino más bien la inhibición de componentes citoplasmáticos cruciales para la célula. Por lo tanto, la capacidad de los péptidos catiónicos en general para permeabilizar membranas citoplasmáticas puede ser un medio para llegar a una diana intracelular (Wu *et al* 1999; Xiong *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2010). También se ha descrito que los AMPs poseen propiedades anti-virales, como la inhibición de la fusión viral, lo cual puede prevenir la infección y la propagación viral a través de interacciones directas con él y sobre la superficie de la célula huésped (Peters *et al.*, 2010).

La toxicidad selectiva que poseen estos péptidos catiónicos por la membrana diana, es un requisito esencial de cualquier agente antimicrobiano para poder distinguir la célula invasora del resto y no dañar al hospedero. Además las propiedades de estos tipos de moléculas les otorgan una serie de ventajas como futuros agentes terapéuticos; sumándole a su actividad antimicrobiana de amplio espectro y rápida inducción de la muerte microbiana, se le debe agregar la incapacidad de ser afectados por los mecanismos de resistencia que sufren los antibióticos clásicos (Hancock & Scott, 2000).

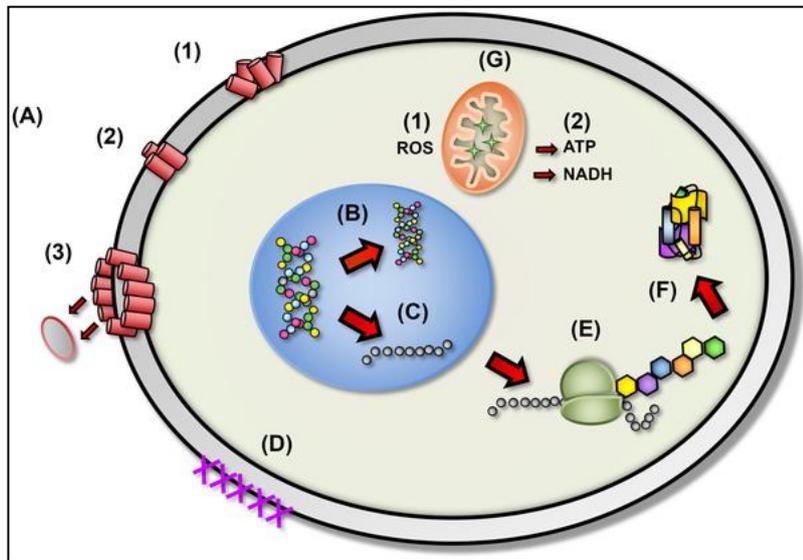


Figura 5. Diferentes mecanismos de acción de los AMPs. (A) Ruptura de la integridad de la membrana: (1) los AMPs se insertan al azar en la membrana; (2) interactúan entre sí a través de sus secuencias hidrofóbicas lo que causa (3) que una parte de la membrana sea removida y se forma un poro. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) Bloqueo de la síntesis de ARN. (D) Inhibición de las enzimas necesarias para la síntesis de la estructura de la pared celular. (E) Inhibición de ribosomas. (F) Bloqueo de chaperonas impidiendo el plegamiento de proteínas. (G) Inactivación de la mitocondria: (1) inhibición de la cadena respiratoria, (2) ruptura de la membrana mitocondrial. Extraído de Peters *et al.*, 2010.

1.5 Defensinas de plantas

A pesar de la heterogeneidad de las familias, los principales grupos de AMPs en plantas están representados por defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, ciclótidos y esnaquinas (Figura 6) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Las primeras defensinas vegetales fueron aisladas de granos de trigo y cebada a principios de la década de 1990, (Colilla *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 1990). En ese momento estas proteínas eran llamadas γ -tioninas debidos a su similitud en tamaño y contenido de cisteínas a las tioninas. Posteriores análisis estructurales revelaron que las γ -tioninas no están relacionadas a las tioninas (Bruix *et al.*, 1993), sino que poseen similitud estructural con las defensinas de mamíferos e insectos (Figura 7A). Las γ -tioninas fueron renombrados a defensinas vegetales en 1995 por Terras y colegas, que aislaron dos proteínas antifúngicas de semillas de rábano (*Raphanus sativus*).

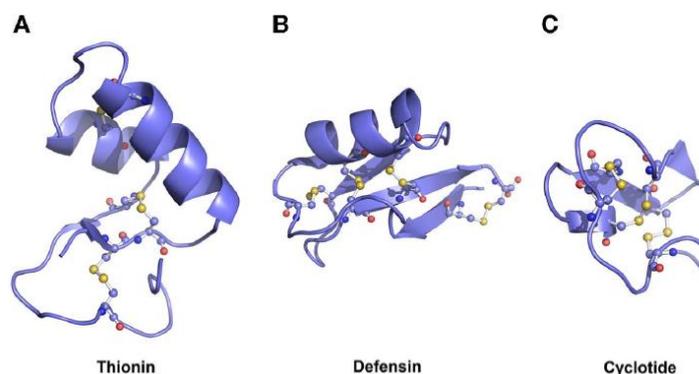


Figura 6. Estructuras tridimensionales de algunos tipos de péptidos antimicrobianos de plantas. (A) Tionina - *Viscum album* viscotoxin A3. (B) defensina – *Vigna radiata* defensina-2. (C) Ciclótido *Viola odorata* violacin A. Extraído de Silva *et al.*, 2011.

Las defensinas vegetales son péptidos pequeños, básicos con valores de pI de alrededor de 9,0 y son de 45-55 aminoácidos de longitud, con masas moleculares que oscilan entre 5 y 7 kDa (Carvalho & Gomes, 2009). Contienen un número par de residuos cisteína, en un motivo conservado C-X10-C-X3-8-C-X3-C-X7-10-C-X-C-X3-C, que estabilizan la estructura característica que consiste en una sola hélice α y tres hojas β antiparalelas mediante la formación de puentes disulfuro (Figura 7B). La estructura formada, conocida como motivo estabilizado por cisteínas CS $\alpha\beta$, es muy conservada en AMPs aislados de varios procariontes y eucariotas superiores (de Beer & Vivier, 2011). A pesar de poseer una

estructura terciaria conservada, las defensinas vegetales comparten muy poca homología a nivel de aminoácidos. Esta variabilidad en la secuencia de aminoácidos contribuye a las diferentes funciones biológicas que se han atribuido a estos péptidos, en los que un solo aminoácido puede cambiar el espectro de actividad exhibido por péptidos estrechamente relacionados (de Beer & Vivier, 2011).

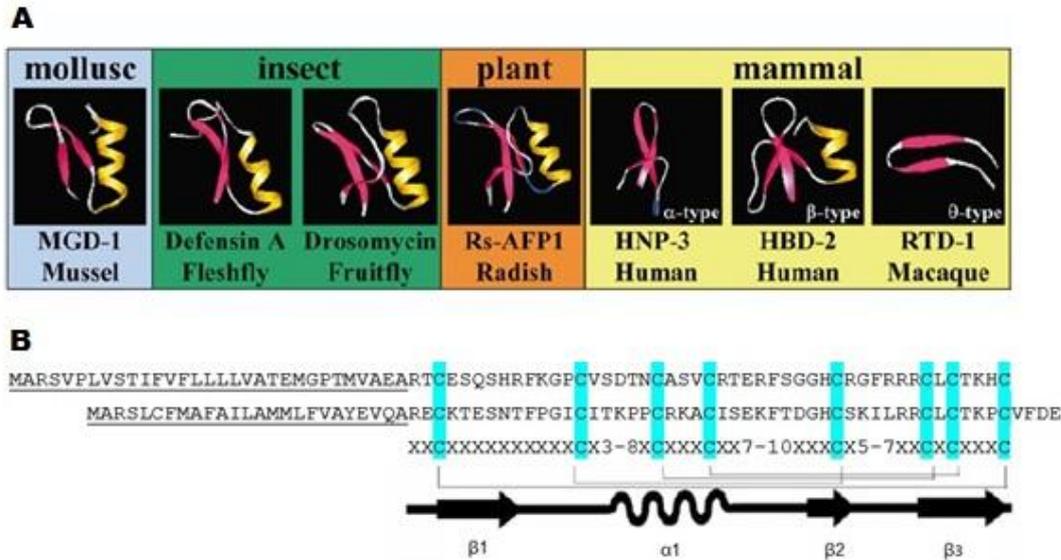


Figura 7. (A) Estructura tridimensional de defensinas invertebrados (insectos y moluscos), plantas y vertebrados (mamíferos). Extraído de Thomma *et al.*, 2002. **(B)** Estructura primaria. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dos clases de defensinas vegetales: PdeI_Vgun (GenBank ACN93800) de *Vigna unguiculata* y NAD1 (Q8GTM0) de *Nicotiana glauca*. Las cisteínas están sombreadas celeste y las líneas de conexión entre los residuos indican enlaces disulfuro. Subrayado se indica la secuencia del péptido señal. Extraído de Padovan *et al.*, 2010.

Las defensinas de plantas parecen expresarse principalmente en capas de la periferia, lo cual es consistente con un papel en la primera línea de defensa contra patógenos. Por ejemplo, se encuentran en las paredes de la superficie de esporofitos de rábano, en capas de células periféricas de los órganos de la flor del tabaco y en la capa de células epidérmicas y en las hojas de primordios de tubérculos de papa. También se encuentran en las células de estomas y en las paredes de las células que recubren las cavidades subestomáticas de hojas de remolacha (Kragh *et al.* 1995), lo cual es interesante ya que los estomas son bien conocidos como puntos de entrada para hongos patógenos (Revisado por Thomma *et al.*, 2001).

Durante las dos últimas décadas, varias defensinas de plantas han sido purificadas con la posterior prueba de su actividad biológica. Curiosamente, las defensinas al igual que otros AMPs vegetales presentan actividad antimicrobiana no sólo contra patógenos de las plantas, sino también contra hongos, virus, parásitos, bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas que infectan a los seres humanos (Hancock & Scott 1998; Zasloff, 2002; Brogden *et al.*, 2003). Además de su función antimicrobiana, estos péptidos también muestran actividades que tienen importantes aplicaciones médicas como ser: inhibición de proteasas, actividad contra el cáncer, rol como moléculas efectoras durante la inflamación, la activación inmune y la cicatrización de heridas (Yang *et al.*, 2002; Koczulla & Bals, 2003; Yang *et al.*, 2004; de Beer & Vivier, 2011). Por lo tanto, la identificación y el aislamiento de nuevas defensinas y de otros péptidos vegetales asociados a la defensa contra los patógenos tienen por objeto proporcionar nuevas alternativas para reducir las pérdidas de rendimiento en la agricultura, así como para identificar nuevas moléculas antimicrobianas potencialmente útiles en medicina y la industria. A pesar de la gran cantidad de resultados de investigación con respecto a los AMPs de plantas, hay poca información sobre tales péptidos derivados de especies de plantas silvestres de América del Sur (Montesinos, 2007; Pelegrini *et al.*, 2009).

En la búsqueda de plantas nativas, en nuestro laboratorio se selecciono para este trabajo el gen *EcgDf1* proveniente de brotes de *Erythrina crista-galli* (Ecg), más comúnmente conocida como Ceibo, declarada “flor nacional” en nuestro país. El gen y ADNc de *EcgDf1* fueron aislados por Susana Rodriguez-De cuadro (resultados sin publicar), el ADNc correspondiente fue clonado en el vector pGEM-Teasy.

1.6 Producción de defensinas vegetales – expresión heteróloga

El estudio de una proteína requiere de su aislamiento y producción en cantidad y su posterior purificación. Una de las técnicas más usadas para la producción de defensinas vegetales a mediana y gran escala es la expresión heteróloga en diversos hospederos, tales como bacterias, levaduras, hongos y plantas, por su alto rendimiento y bajo costo. La síntesis química facilita la producción de cantidades moderadas de péptidos con un alto grado de pureza, pero no es común, debido a las dificultades que esta técnica presenta, en relación con el tamaño de estos péptidos y la presencia de varios enlaces disulfuro (Padovan *et al.*, 2010). Otro enfoque, es la purificación a partir de extractos vegetales con actividad biológica, donde la misma se va siguiendo a medida que se avanza por las etapas de fraccionamiento. Sin embargo este método requiere un importante volumen de muestra, organismos o partes enteras, para asegurar un nivel significativo de actividad antimicrobiana, además de ser un proceso lento y tedioso (Silva *et al.*, 2011).

En expresión heteróloga, varios sistemas (organismo productor/vector) se han desarrollado para alcanzar una producción costo-efectiva de varias proteínas. Entre los sistemas microbianos, *Escherichia coli* es uno de los más populares debido a su alta tasa de crecimiento, requerimientos de bajo costo y vasto conocimiento sobre su genética y fisiología. Además, se han generado varios sistemas cepa/vector con funciones alteradas que favorecen la producción (Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y en particular la expresión de defensinas, a menudo resulta en la acumulación de las proteínas de interés en forma de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Éstos por lo general consisten en proteínas mayoritariamente mal plegadas y por lo tanto biológicamente inactivas (Kovalskaya *et al.*, 2009). Algunas estrategias para favorecer la obtención de la proteína en la fracción soluble son: 1) asociarla a un péptido *carrier*, la cual a menudo hace más estable a la proteína de interés además de ayudar a su obtención en la fracción soluble (Terpe, 2003); 2) optimizar el uso de codones, ya que si la secuencia de interés contiene codones raros para el hospedero, se puede originar una terminación prematura de la síntesis de la proteína recombinante o alterar completamente la información genética. En el caso de las defensinas también es importante trabajar con una cepa que favorezca la formación de puentes disulfuro. Además es común fusionarlas con una etiqueta de afinidad que facilita su purificación. Sin embargo, la posterior escisión de la etiqueta o el *carrier* no siempre es completa y los residuos

aminoácidos restantes pueden tener un efecto negativo en la estructuración y actividad del péptido maduro aislado (Sels *et al.*, 2007). Kant y colaboradores (2009) informaron que, de hecho, las defensinas marcadas con una etiqueta de histidinas aumentaron su actividad luego de la completa eliminación de la misma.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Expresión heteróloga del péptido EcgDf1 y evaluación de actividad antimicrobiana del péptido recombinante.

2.2 Objetivos específicos

1. Subclonado de secuencia ADNc correspondiente al péptido maduro de EcgDf1 en vector de expresión.
2. Producción de péptidos de fusión Trx-EcgDf1-His6: comparación de dos sistemas cepa/vector.
3. Purificación y clivaje del péptido recombinante.
4. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a distintos microorganismos.

3 Resultados y Discusión

3.1 Subclonado defensiva de ceibo (EcgDf1)

La secuencia *EcgDf1* correspondiente al péptido maduro fue subclonada en el vector de expresión pET-102 utilizando *restriction-free cloning* (RF-cloning, van den Ent *et al.*, 2006) (Figura 8). Este método se basa en la fusión por PCR de dos secuencias que se solapan en dos pequeñas zonas (20-30 pb). Como no utiliza enzimas de restricción, permite generar una proteína de fusión sin residuos adicionales provenientes del procedimiento de clonación (Van den Ent y Löwe, 2006).

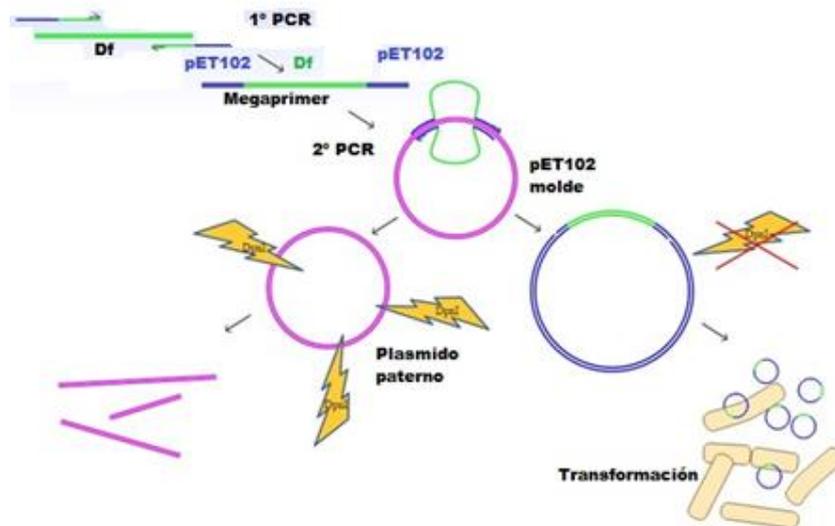


Figura 8. Representación esquemática de estrategia de subclonado por restriction-free. Gen *EcgDf1*: verde; plásmido parental: rosado; cebadores híbridos diseñados con secuencia complementaria del inserto deseado y del plásmido diana: verde y azul. Estos cebadores se usan para amplificar el inserto con una polimerasa de alta fidelidad. El producto resultante previamente purificado se utiliza como "mega-cebador" en una segunda reacción de PCR, con el plásmido diana actuando como molde. Una vez hibridado con el vector la polimerasa extiende e incorpora el gen en una molécula de ADN mellado, circular. El vector parental metilado es digerido con DpnI y el ADN doble mellado de doble hebra circular se usa para transformar células bacterianas competentes.

El plásmido de expresión pET-102 está diseñado de tal manera que la expresión del péptido EcgDf1 quedará asociada una proteína *carrier* en el amino terminal: la tiorredoxina (Trx). La misma podrá eliminarse gracias a que el vector posee un sitio de corte para la enzima enteroquinasa (Ek). Además en el extremo C-terminal lleva una His6-tag para facilitar su purificación, la cual podrá ser removida gracias al sitio de reconocimiento para el factor Xa. La expresión de la proteína recombinante Trx-EcgDf1-His-tag está bajo el control de un promotor T7 (Figura 9).

A

```

M G S D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I L V D F W A H W
1  ATGGGATCTGATAAAATATTCATCTGACTGATGATTCTTTTGATACTGATGTACTTAAGGCAGATGGTGCAATCCTGGTTGATTCTGGGCACACTGGT
  TACCCTAGACTATTTAATAAGTAGACTGACTACTAAGAAAATAGACTACATGAATTCCGCTTACCACGTTAGGACCAACTAAAGACCCCGTGTGACCA
C G P C K M I A P I L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D H N P G
101 GCGGTCCGTGCAAAATGATCGCTCCGATTCGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCACAACCCGGG
  CGCCAGGCACGTTTTACTAGCGAGGCTAAGACCTACTTTAGCGACTGCTTATAGTCCCGTTTGACTGGCAACGTTTTGACTTGTAGCTAGTGTGGGCC
T A P K Y G I R G I P T L L L F K N G E V A A T K V G A L S K G Q
201 CACTGCGCCGAAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAG
  GTGACGCGGCTTTATACCGTAGGCACCATAGGGCTGAGACGACGACAAGTTTTTGCCTTACCAGCGGTTGGTTTACCCACGTGACAGATTTCCAGTC
L K E F L D A N L A G S G S G D D D D K R T C E S Q S H R F K G P
301 TTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGCTCTGGATCCGGTGATGACGATGACAAGAGAACATGCGAGTCTCAAAGCCATCGTTTCAAAGGACCAT
  AACTTTCTCAAGGAGCTGCGATTGGACCGGCGGAGACCTAGGCCACTACTGCTACTGTTCTTTGTACGCTCAGAGTTTCGGTAGCAAAGTTCCCTGGTA
C L S D T N C G T V C R T E R F T G G H C R G F R R R C F C T K H C
401 GTTTGAGTGACACAACTGTGGCACTGTTGTGCAACCGAACGTTTACCAGGTGGTCATTGCCGTGGTTCCGTCGCAGATGCTTCTGCACCAAACTG
  CAAACTCACTGTGTTTGACACCGTGACAAACAGCTTGGCTTGCAAAGTGGCCACCAGTAACGGCACCAAGGCAGCGCTACGAAAGACGTGGTTTGTGAC
I E G R H H H H H H *
501 TATCGAGGGAAGGCATCATCACCATCACCATTGA
  ATAGCTCCCTCCGTAGTAGTGGTAGTGGTAACT

```

B

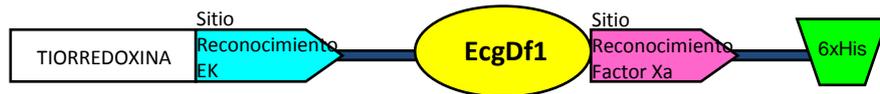


Figura 9: A) Secuencia de Trx-EcgDf1-Histag. Tiorredoxina sin sombreado; Péptido maduro sombreado en amarillo; sitio de corte para enteroquinasa sombreado en celeste; sitio de corte para factor Xa sombreado en rosa; cola de histidinas: sombreado en verde. *Primers*: forward subrayado en rojo y reverse subrayado en azul. **B) Representación esquemática del péptido de fusión-defensina.**

Para introducir la secuencia que codifica el péptido en una primer etapa se sintetiza el inserto por amplificación con cebadores específicos en los extremos de la misma. El *primer forward* posee 21 bases complementarias al extremo 5' del gen de interés y además 20 bases que hibridan con el vector pET-102, ubicadas en el extremo 5' del cebador. El *primer reverse* reconoce al vector por 43 bases complementarias al extremo 3' del punto de inserción seguido de 21 bases del extremo 3' del gen de interés (Figura 9A). Como resultado de la amplificación se obtuvo el fragmento de interés con sitios de cebados únicos en cada extremo, los cuales son complementarios a las secuencias que flanquean el sitio de inserción en el vector. Los productos obtenidos fueron del tamaño esperado próximo a las 200 pb (Figura 10).

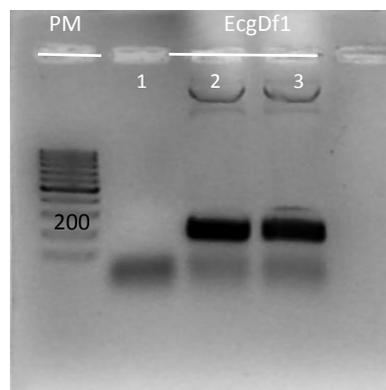


Figura 10: Amplificaciones de *megaprimer* a distintas temperaturas. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Carril 1: Blanco (sin ADN); Carriles 2 y 3 *megaprimer* con temperatura de hibridación a 58° y 60° C respectivamente. PM: Marcador de peso molecular de 100pb (Thermo).

La banda resultante de la amplificación se purificó utilizándose como *megaprimer* en una segunda reacción de PCR en donde la secuencia de interés se incorpora al vector pET-102. El plásmido parental es eliminado en base a su metilación, utilizando la enzima DpnI y el producto final, se utiliza para transformar *E. coli* TOP10 por electroporación. En esta segunda reacción de PCR se utilizó un control sin *megaprimer* para verificar el éxito de la digestión con DpnI. Cinco colonias fueron aisladas confirmando la presencia del plásmido mediante minipreps y gel de agarosa (Figura 11). En el control sin *megaprimer* efectivamente no hubo crecimiento en medio selectivo, por lo cual se puede afirmar que la digestión con DpnI del plásmido parental fue total.

Mediante PCR tiempo final con los mismos *primers* específicos empleados para la síntesis del *megaprimer* (Figura 8A) se confirmó la presencia del inserto en el plásmido. Todas las amplificaciones obtenidas presentaron el tamaño esperado próximo a los 200 pb (Figura 12).

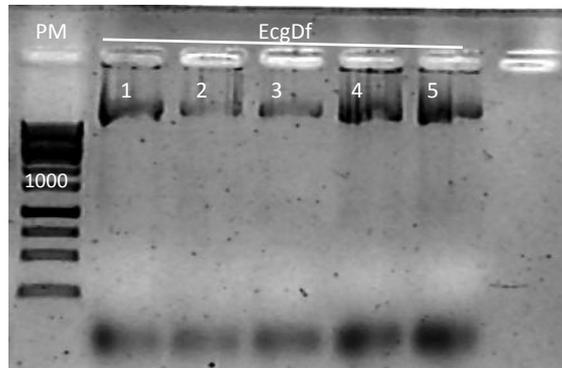


Figura 11: Miniprep plásmido pET102::Trx-EcgDf1-His6. Electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: Plásmido pET-102 con defensina. PM: Marcador de peso molecular de 1Kb (Thermo).

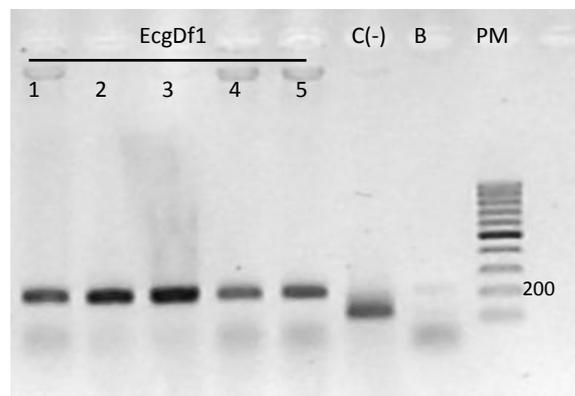


Figura 12. Amplificaciones inserto Trx-EcgDf1-His6 en pET-102. Electroforesis en gel de agarosa 1,7%. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: Defensina. C (-): Control negativo, plásmido pET-102 sin el inserto. B: Blanco, sin ADN. PM: Marcador de peso molecular de 100pb (Thermo).

A través de secuenciación y el uso de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se comparó la secuencia teórica pET102::Trx-EcgDf1-His6 construida con el programa VectorNTI con las obtenidas. Se confirmó que todos los clones analizados contenían la secuencia EcgDf1 correcta y en el marco de lectura adecuado., Uno de ellos fue seleccionado para continuar con las siguientes etapas de trabajo (pET102::EcgDf).

3.2 Producción defensiva recombinante

Con el objetivo de obtener el péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en la fracción soluble y en cantidades adecuadas para su purificación, se evaluaron diferentes condiciones de expresión, temperatura de crecimiento y tiempo post-inducción en dos hospederos diferentes *E. coli* BL21 (DE3) (BL21) y Rosetta-gami (DE3) (Rg) con el vector de expresión antes construido pET102::EcgDf. La cepa Rg se seleccionó ya que la misma favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma lo cual es fundamental para el correcto plegamiento de este tipo de péptidos; y la cepa BL21 por ser la cepa típica de expresión. Como control se analizó en paralelo la expresión de pET102::Trx (sin EcgDf1). Los resultados se visualizaron a través de electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 13).

Los valores teóricos del peso molecular y punto isoeléctrico del péptido de fusión Trx-EcgDf1-His6 se calcularon con programa ProtParam en la plataforma ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam>), dando como resultado 19502 Da y 7.17 respectivamente. También se determinó el peso molecular teórico de la tiorredoxina y la defensina con valores de 12815 y 6705 Da respectivamente.

Observando el resultado de los geles claramente se ve la diferencia entre todas las fracciones inducidas (Df I) y sin inducir con IPTG (Df ni). En todas las condiciones evaluadas ya sea con la cepa BL21 o Rg, a 20°C o 28°C y a todos los tiempos post-inducción evaluados se obtuvo el péptido recombinante en la fracción soluble. A pesar de que se observan bandas más intensas en las fracciones insolubles (indicadas con flecha en color rojo) que en las fracciones solubles (indicadas con flechas de color verde), la cantidad observada en la fracción soluble es suficiente para proseguir con la purificación del péptido Trx-EcgDf1-His6. Cabe destacar que la fracción insoluble contiene una cantidad menor de contaminación con parte de la fracción soluble debido a que no se realizaron lavados al pellet obtenido luego de la centrifugación del cultivo. En las cepas control (plásmido sin inserto), las flechas en color negro indican la presencia de la tiorredoxina. Se observó que las condiciones más efectivas para la recuperación del péptido Trx-EcgDf1-His6 fueron a 28°C y 24 horas post-inducción con ambas cepas BL21 y Rg, pero por la relación entre las fracciones insolubles/solubles en ambas cepas se eligió trabajar con la cepa *E. coli* Rosetta-gami en las condiciones mencionadas anteriormente.

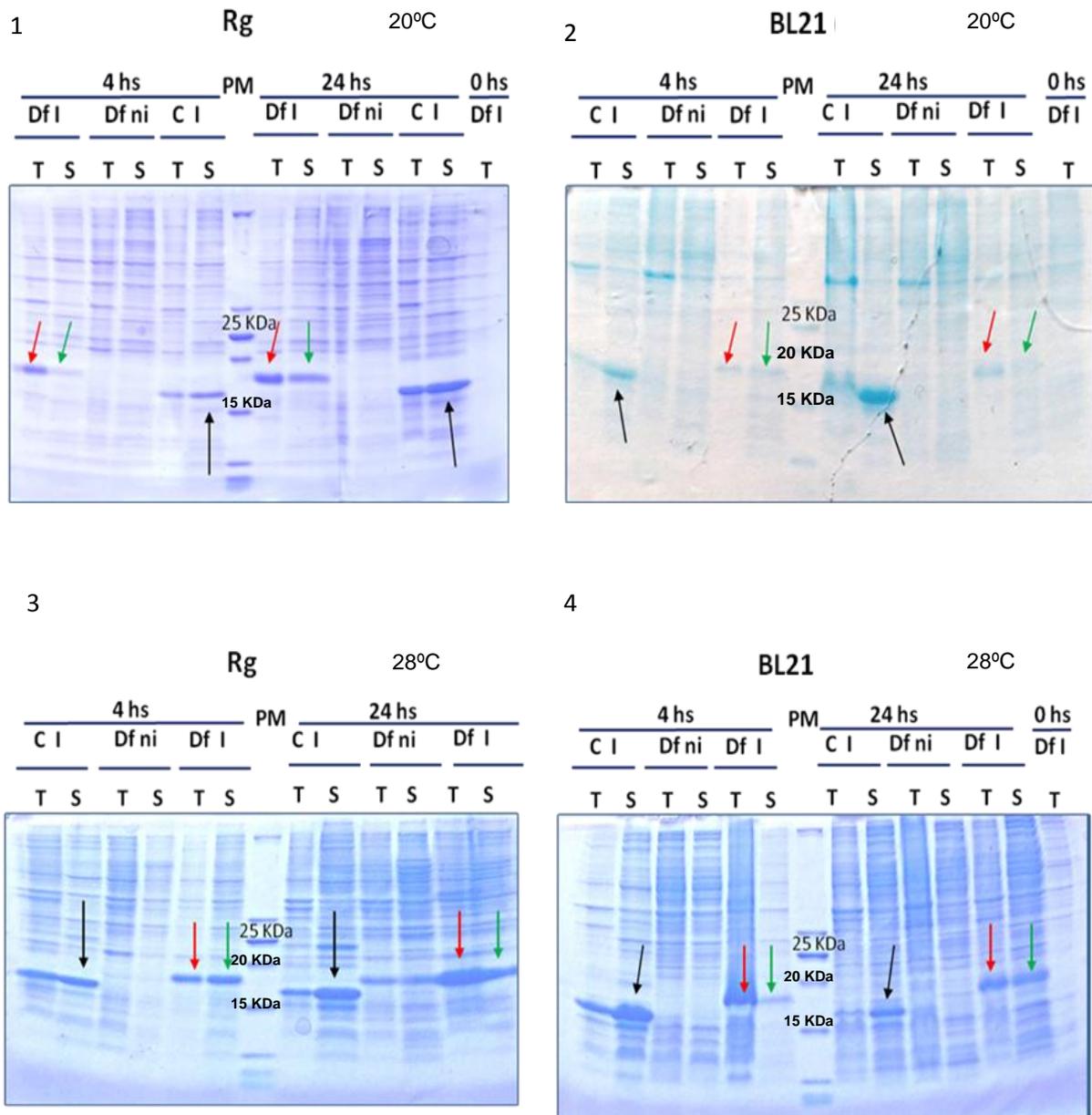


Figura 13. Producción del péptido recombinante. Electroforesis SDS-PAGE gels de poliacrilamida 15% Tris-Glicina mostrando las diferentes condiciones, sistema cepa/vector, temperatura de crecimiento y tiempo post-inducción, evaluadas. 1 y 2: temperatura de post-inducción 20°C. 3 y 4: temperatura de post-inducción 28°C. C: Control Trx; Df: Trx-EcgDf1-His6; I: Inducido con IPTG; ni: no inducido; T: Fracción Insoluble; S: Fracción Soluble. PM: Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher).

Para ver que en la fracción total no se estaba perdiendo péptido recombinante soluble, se hicieron lavados (carril L, Figura 14). Se vio que efectivamente había una importante cantidad de nuestro péptido de fusión que se estaba perdiendo. En adelante cada vez que se expresó el producto se le aplicó dos lavados a la fracción insoluble con parte de la fracción soluble y lo recuperado se sumó a la fracción soluble con el objetivo de recuperar la mayor cantidad del péptido Trx-EcgDf1-His6 soluble para su posterior purificación.

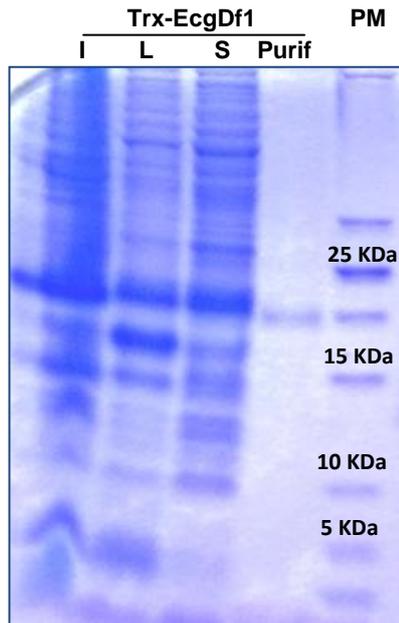


Figura 14. Lavados del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6. Electroforesis SDS-PAGE (15%) tris-tricina. Trx-EcgDf1 T: fracción insoluble más parte de la fracción soluble; Trx-EcgDf1 L: Lavado con buffer de lisis (20 mM imidazol) de la fracción insoluble más parte de fracción soluble; Trx-EcgDf1 S: fracción soluble; Trx-EcgDf1 Purif: Trx-EcgDf1-His6. En cada carril se sembraron 15 μ L. PM: Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher).

3.3 Purificación del péptido recombinante

El péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 es purificado por cromatografía de afinidad por inmovilización con metales (IMAC-Cu²⁺) gracias a que presenta en el C-terminal un motivo de seis histidinas (His-tag) asociado.

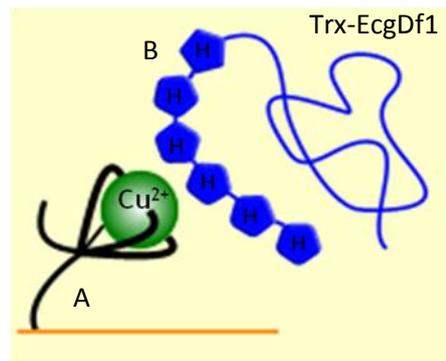


Figura 15. Esquema representativo del principio fisicoquímico de la cromatografía por afinidad con metales inmovilizados. (A) Matriz que contiene los iones cobres a la cual se une la etiqueta de histidinas de la proteína de manera reversible. (B) Proteína de interés con la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal.

En una primera instancia se analizaron fracciones eluidas con un gradiente de imidazol (20 a 300 mM), para determinar las concentraciones necesarias tanto para eliminar el resto de las proteínas de la fracción soluble, como la concentración necesaria para eluir el péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 (Figura 16). Se vio que los lavados 20 y 30 mM de imidazol son suficientes para eluir las demás proteínas quedando la proteína de fusión retenida por la etiqueta de histidinas, mientras que para desplazar la unión de la etiqueta de afinidad de péptido recombinante y eluirlo completamente se necesita una concentración de 300 mM de competidor.

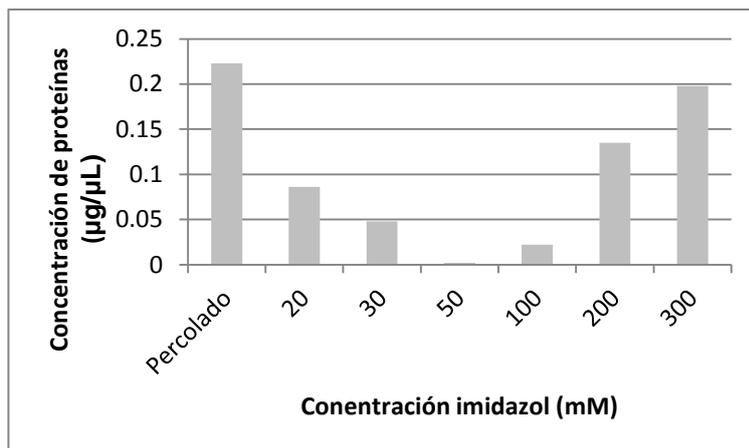


Figura 16. Concentración de eluciones de proteínas en función de la concentración de competidor. Barras en azul: concentración obtenida por método de Bradford (µg/µL).

En la figura 17 se muestra los resultados de la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de ciertas fracciones recolectadas durante la cromatografía por afinidad. En el percolado (P), fracción de las proteínas que no fueron retenidas por la columna, se observa la presencia de bandas que no corresponden a Trx-EcgDf1. En los lavados con 20 mM imidazol (L0) y 30 mM imidazol (L1) se observa la presencia de bandas tenues pero sin ser el péptido de interés. Con 300 mM imidazol como era de esperarse se observa una banda correspondiente al peso molecular de la Trx-EcgDf1-His6 que desaparece en la fracción 9 lo que indica el fin de la elución de la proteína recombinante. La purificación fue seguida por medición de absorbancia a 280 nm y por cuantificación por método de Bradford. Los resultados se comparan en la tabla I.

En el gel la elución con 300 mM imidazol muestra un máximo del péptido de interés en la fracción E4 y una disminución en las fracciones siguientes (E6-E9). Las medidas por método de Bradford coinciden, mientras que las medidas por absorbancia a 280 nm no muestran el mismo comportamiento en los puntos finales (E6-E9). La variación entre los métodos de cuantificación pueden deberse a que el péptido Trx-EcgDf1 no posee suficientes aminoácidos aromáticos (12 aminoácidos detectables), lo cual dificulta su cuantificación por espectrofotometría a 280 nm, mientras que sí contiene los aminoácidos necesarios para su detección por método de Bradford (aminoácidos catiónicos como arginina y lisina, 32 en total), aunque no se puede descartar interferencia con imidazol. En las eluciones correspondientes al percolado y lavados a baja concentración de imidazol, las diferencias no son tales debido a que la variedad de proteínas presentes tienen diferentes composición aminoacídica que compensan las diferencias entre lo que miden estos métodos. Por lo tanto se optó por realizar los seguimientos posteriores únicamente por método de Bradford.

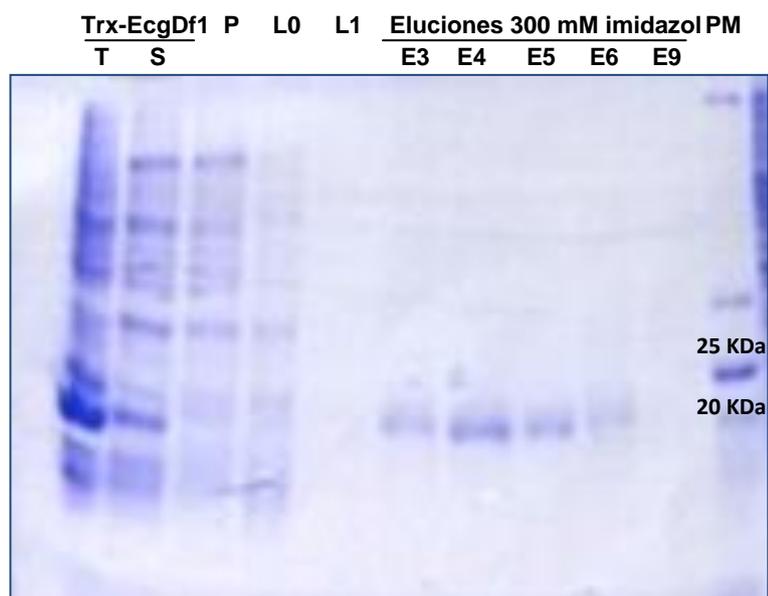


Figura 17. Purificación del péptido recombinante tiorredoxina-EcgDf. Electroforesis SDS-PAGE (15%) de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de Trx-EcgDf1-His6 por cromatografía de afinidad (IMAC-CU²⁺) mediante gradiente de imidazol. Trx-EcgDf1 T: fracción total; Trx-EcgDf1 S: fracción soluble de la expresión del producto. P: Percolado. L0: lavado con buffer de lisis (20 mM imidazol); L1: lavado con buffer de lisis conteniendo 30 mM imidazol. E3-E9 eluciones de tiorredoxina-EcgDf1-His6 con 300 mM imidazol. En cada carril se sembraron 10 μ L. PM: Marcador de peso molecular 100 KDa (ThermoFisher).

Tabla I. Seguimiento de la purificación. Se muestra los valores obtenidos mediante el método de Bradford y absorbancia de 280 nm de las fracciones mostradas en el gel de poliacrilamida.

Fracción	Abs _{280nm}	Abs _{595nm}	Concentración por método de Bradford (mg/mL)
P _{E2}	3.0	0.385	0.2
L0 _{E3}	3.0	0.249	0.127
L1 _{E2}	0.059	0.037	0.0127
300Mm _{E3}	0.197	0.132	0.0640
300Mm _{E4}	0.450	0.135	0.0657
300Mm _{E5}	0.418	0.120	0.0576
300Mm _{E6}	0.711	0.124	0.0595
300Mm _{E9}	0.345	0.028	0.00820

Los resultados obtenidos muestran que el péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 se unió a la columna y que el mismo eluye con 300 mM de imidazol, siendo la purificación exitosa. Las eluciones donde se obtuvo el péptido recombinante fueron agrupadas, dializadas y liofilizadas.

3.4 Clivaje de proteína de fusión y purificación

Para tener una visión más acertada de la actividad que posee la defensina es necesario eliminar la tiorredoxina (que fue útil para su solubilización), pues se ha reportado que la actividad aumenta considerablemente al eliminar la misma (Kovaleva *et al.*, 2011). La digestión del péptido Trx-EcgDf1-His6 se lleva a cabo con la enzima enteroquinasa cuyo sitio de corte se encuentra codificado en el plásmido de expresión, para luego purificarla nuevamente mediante IMAC-Cu²⁺. Los resultados se visualizaron por SDS-PAGE con geles Tris-Tricina que permiten mejorar la resolución para moléculas de bajo peso molecular (Schägger & von Jagow *et al.*, 1987).

Con el objetivo de obtener el más alto rendimiento de péptido Ecg-Df1-His6 purificado, se procedió a realizar distintos ensayos para determinar cuales eran las condiciones más favorables para el proceso de digestión y purificación del péptido recombinante, los cuales se esquematizan en el diagrama de fusión mostrado en la figura 18 y desarrollado en detalle en las siguientes secciones.

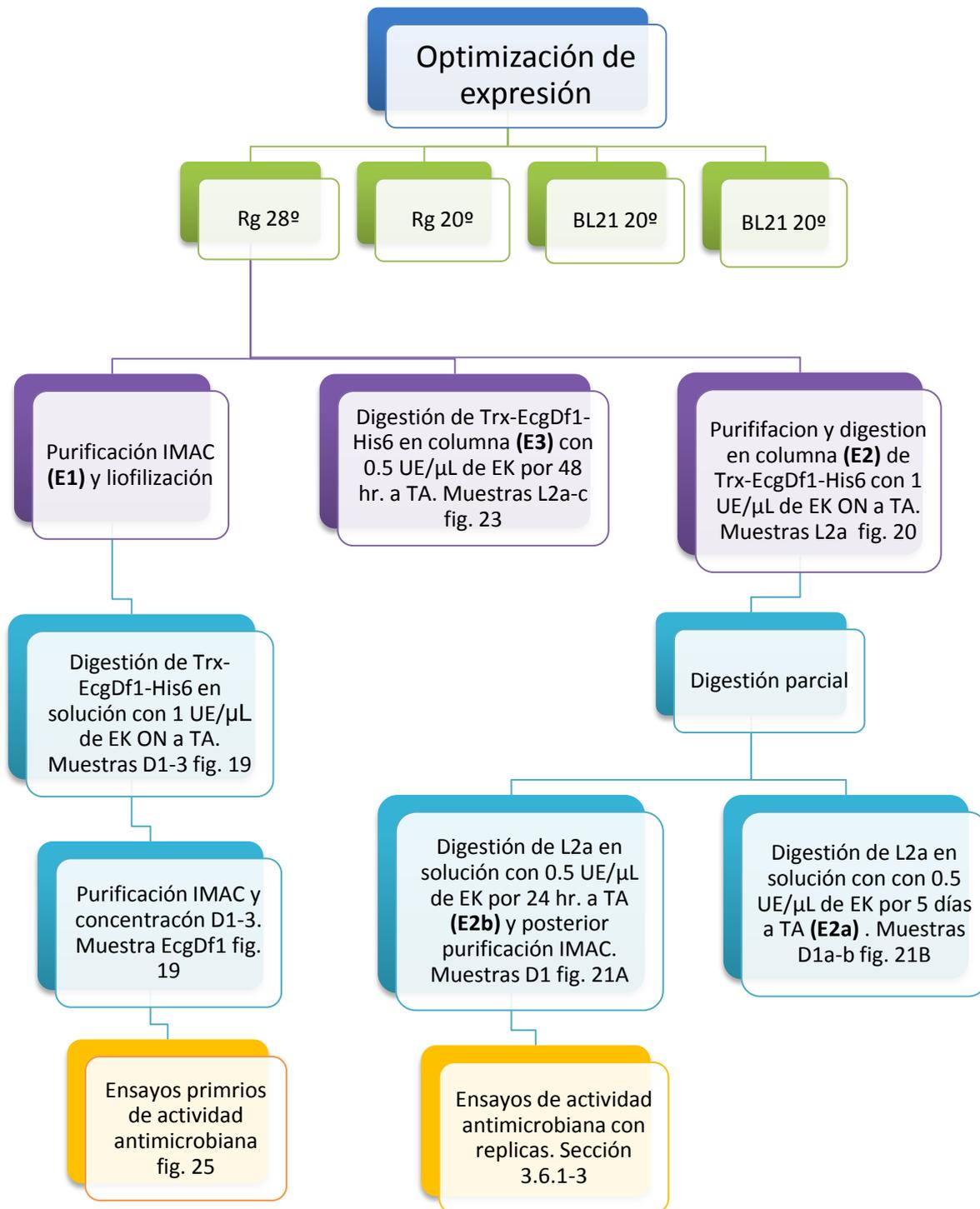


Figura 18. Diagrama de flujo: Optimización del proceso de digestión y purificación del péptido recombinante Ecg-Df1-His6.

3.4.1 Digestión y purificación del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en solución (E1)

A través de un ensayo piloto con diferentes concentración de enzima EK, se determinó que 1 UE/ μ L fue suficiente para digerir 2.3 μ g de péptido Trx-EcgDf1-His6, por lo que se empleó 20 UE/ μ L para digerir 46.8 μ g de péptido de fusión (Cf: 0.03 UE/ μ L) ON a temperatura ambiente (TA) (muestras D1 a D3 Figura 19). Se observó la disminución o desaparición de la banda de 19 KDa correspondiente al péptido Trx-EcgDf1-His6 y la aparición de una banda próxima a los 13 KDa correspondientes a la tiorredoxina. Estos resultados indican que la digestión fue exitosa. Sin embargo, no se observa la banda esperada alrededor de 6,7 KDa para el péptido EcgDf1-His6. Cuando se juntan las muestras D1-D3 luego de ser purificadas y concentradas, se observa una banda de 5 KDa (un poco menor al tamaño esperado para EcgDf1-His6 (muestra EcgDf1 Figura 19)), lo que demuestra el éxito de la remoción del *carrier*. Como era de esperarse en el percolado de la segunda purificación (PE2) no se observa la presencia de la defensina. Si bien la defensina migra en 5 KDa por debajo de lo esperado 6.7 KDa, se verifica que posee actividad antimicrobiana contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* y *Aspergillus niger* (ver sección 3.5). La diferencia en el comportamiento migración con el peso molecular esperado podría explicarse a que la defensina no está reducida completamente y por tanto algunas cisteínas podrían estar formándose alguno o algunos puentes disulfuro, debido a que el agente reductor no fue suficiente. También se puede suponer que debido a la naturaleza catiónica de estos péptidos no le permite al SDS enmascarar todas las cargas positivas dentro del péptido (Herbel *et al.*, 2015).

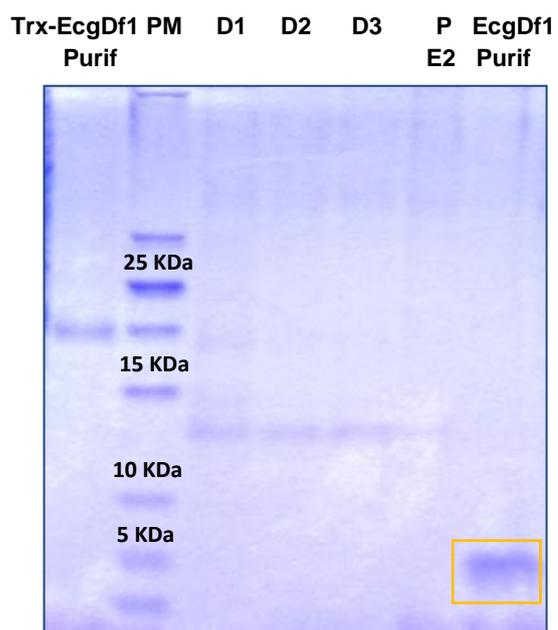


Figura 19. Digestión del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en solución. Electroforesis SDS-PAGE (15%) tris-tricina. Trx-EcgDf1 Purif: fracción purificada. D1-D3: digestiones con enteroquinasa 1UE/ μ L. PE2: percolado de la segunda purificación. EcgDf1 Purif: Péptido de fusión Ecg-Df1-His6 purificado. En cada carril se sembraron 15 μ L. PM: Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher).

3.4.2 Digestión y purificación del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en columna (E2)

Con el objetivo de aumentar el rendimiento y disminuir los tiempos de purificación se ensayó la digestión directamente en columna (Figura 20), para luego eluir el péptido EcgDf1-His6 libre de tiorredoxina. De esta forma se evita un ciclo de elución-díalisis-liofilización. Así, después de pasar el extracto por la columna y realizar los lavados con 20 y 30 mM imidazol (muestras T a L1b), se digirió con 1 UE/ μ L de enteroquinasa (0.03 UE/ μ L) ON a TA (E2a). Se recuperó el percolado (P1 y P2) y se lavó con 30 mM (L1). Finalmente se eluyó el péptido EcgDf1-His6 con 300 mM imidazol (L2a-b respectivamente). Como esperado, la tiorredoxina libre eluye con 30 mM de imidazol (muestra L1, figura 20), lo que se verifica por la presencia de una banda de aproximadamente 13 KDa que no está presente en la fracción correspondiente a 300 mM de imidazol (L2a). Sin embargo, la digestión no fue total ya que en la muestra L2a, además de la banda esperada del péptido EcgDf1-His6 (5 KDa), se observa una banda que migra como Trx-EcgDf1-His6. Esto puede deberse a varios factores: podría ser que la cantidad de enzima empleada o el tiempo de acción no fueron suficientes para digerir toda la proteína de fusión presente. También podría deberse a que el ambiente sea menos propicio, con la resina y trazas de imidazol, disminuya la actividad enzimática, o simplemente que al estar unido a la resina adopte una conformación que dificulte el acceso de la enteroquinasa. Hay que tener en cuenta que se trata de un péptido pequeño (57 aminoácidos Ecg-Df1-His6 + 10 de link (6 HisTag + 4 sitio de corte factor Xa)) y que el sitio de corte EK son los únicos residuos que separan la Trx y el péptido EcgDf1-His6.

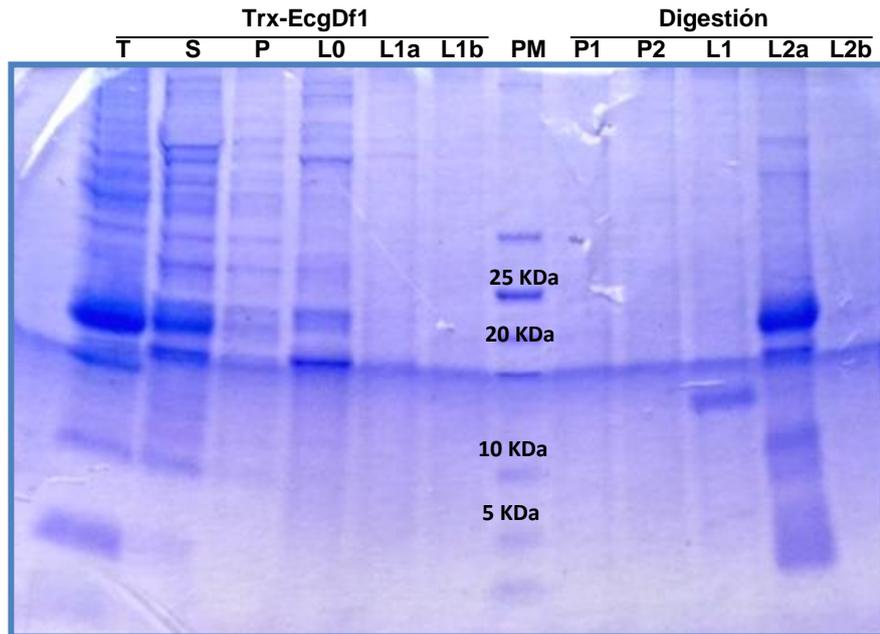


Figura 20. Purificación del péptido recombinante tiorredoxina-EcgDf1 en columna. Electroforesis SDS-PAGE (15%) tris-tricina. Trx-EcgDf1 T: fracción total; Trx-EcgDf1 S: fracción soluble de la expresión del producto. Trx-EcgDf1 P: Percolado. L0: lavado con buffer de lisis (20 mM imidazol); L1a-b: lavado con buffer de lisis conteniendo 30 mM imidazol; Digestión P1-2: Percolado; L1: lavado con buffer de lisis conteniendo 30 mM imidazol. L2a-b: lavado con buffer de lisis conteniendo 300 mM imidazol. En cada carril se sembraron 10 μ L. PM: Marcador de peso molecular 100 KDa (ThermoFisher).

Además en este primer tratamiento, en la muestra L2a (correspondiente a la elución con 300 mM de imidazol) se ven otras bandas que no se obtuvieron en experimentos anteriores, quizás por un tema de cantidad. Que dichas bandas correspondan a otras proteínas que hayan quedado retenidas aun después de los lavados con 30 mM imidazol, no sería probable ya que previamente se demostró que esa concentración es suficiente para eliminar las proteínas sin etiqueta His6 (Sección 3.3). Estas podrían deberse a diferentes conformaciones de la defensina quizás a diferencias en los puentes disulfuro ya que en las condiciones del gel no serían tan fuertes para asegurar la reducción de todos. Las condiciones del gel no cambiaron, pero sí en relación a la cantidad de proteína que se tuvo en esta etapa. Otra posibilidad es que el péptido no esté completo, sino parcialmente degradado. Esto podría explicar la banda inmediatamente debajo de 20 KDa y de 5 KDa. No explica las bandas en el entorno de 10 KDa ni las de más alto peso molecular. La banda de 10 KDa podría tratarse de un dímero del péptido EcgDf1-His6, ya observado para otras defensinas de planta (Lay *et al.*, 2012). Otra explicación a las bandas entorno a 10 KDa podría ser el Trx-Ecg-Df1 incompleto. Mientras que las superiores a 30 KDa entonces podrían tratarse del dímero de Trx-EcgDf1-His6 y del mismo incompleto.

Para completar el clivaje de la muestra L2a, luego de dializarla y liofilizarla, se le aplicó un segundo tratamiento con EK. Para ello se realizó un nuevo ensayo piloto en el cual alícuotas (de una concentración de 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de esta muestra fueron tratadas con diferentes concentraciones de EK: 1, 0.5, y 0.1 $\text{UE}/\mu\text{L}$, durante 24 horas y 5 días a TA, en solución. Con 0.5 $\text{UE}/\mu\text{L}$ de EK a 24 horas se vio una disminución de la digestión parcial del péptido de Trx-EcgDf1-His6, la misma fue completa luego de alcanzado los 5 días de incubación (Figura 20A-B). Al aplicar este segundo tratamiento (E2b) con 29 $\text{UE}/\mu\text{L}$ de EK a 754 μg del péptido de fusión durante 24 horas a TA a la muestra L2a, se puede ver una importante disminución de la digestión parcial (muestra D1, figura 21A), aunque aún se aprecia la banda correspondiente Trx-EcgDf1. También se mantiene el patrón de bandas que corresponderían con las diferentes conformaciones de la defensina. En la imagen 21B se muestra la misma digestión (D1) pero incubada con la enzima por 5 días (D1a-b). El patrón de bandas desapareció quedando solo la banda correspondiente a la tiorredoxina (13 KDa) y una banda próxima a los 10 KDa correspondiente a la defensina. Entonces se puede pensar que la enteroquinasa continuó digiriendo, pues la banda correspondiente a la proteína de fusión desapareció, pero no explica las bandas intermedias intermedias.

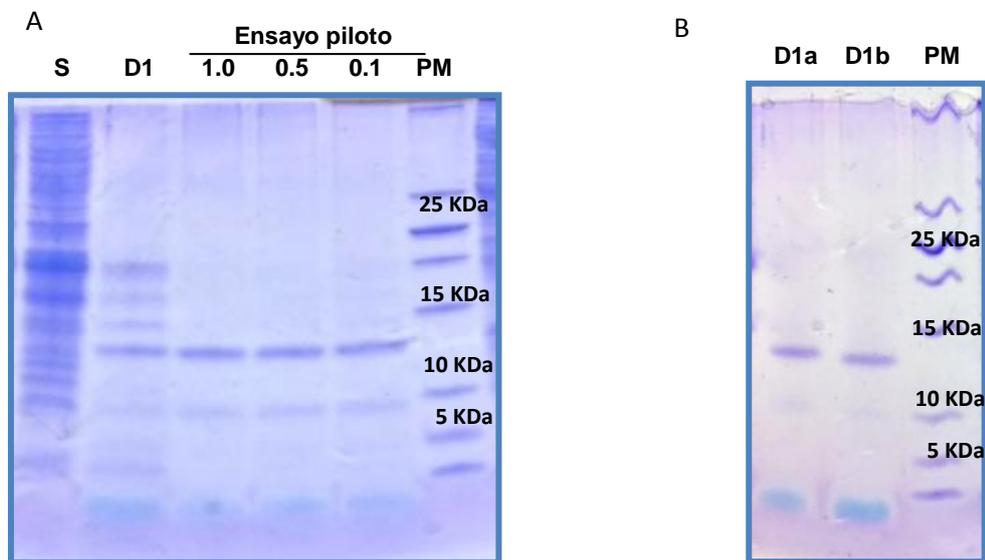


Figura 21. A) Digestión del péptido recombinante purificado Trx-EcgDf1-His6Trx-EcgDf1-His6 en solución tiempo 24 horas. Electroforesis SDS-PAGE (15%) tris-tricina. Electroforesis SDS-PAGE (15%). S: fracción soluble de la expresión del producto; D1: digestión con 1 $\text{UE}/\mu\text{L}$ enteroquinasa. En cada carril se sembraron 15 μL . PM: Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher). **B) D1a-b: Digestión del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en solución tiempo 120 horas.**

Se analizó las muestras D1 (digestión en solución durante 24horas) directamente a través de espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 22). Este estudio reveló un único pico bien definido correspondiente al péptido EcgDf1-His6 (6.678 KDa) en su forma monomérica y la ausencia del péptido de fusión (no se observa ningún pico en el entorno de los 19 KDa), lo cual confirma el éxito de la digestión y que las bandas observadas en los geles corresponden a diferentes conformaciones de las defensina y no a otras proteínas (pues si fuera así deberían aparecer otros picos en el espectro correspondiente a las digestiones de estos péptidos). Que la defensina sea detectada por espectrometría de masas como un monómero de 6.678 KDa, mientras que en la electroforesis SDS-PAGE migre con un peso molecular cercano a 10 KDa, podría explicarse porque la misma podría estar formando un dímero a través de interacciones no covalentes, sino a través de enlaces de hidrógeno como se ha visto para otras defensinas (Lay *et al.*, 2012), los cuales se separan por el método de análisis MALDI-TOF.

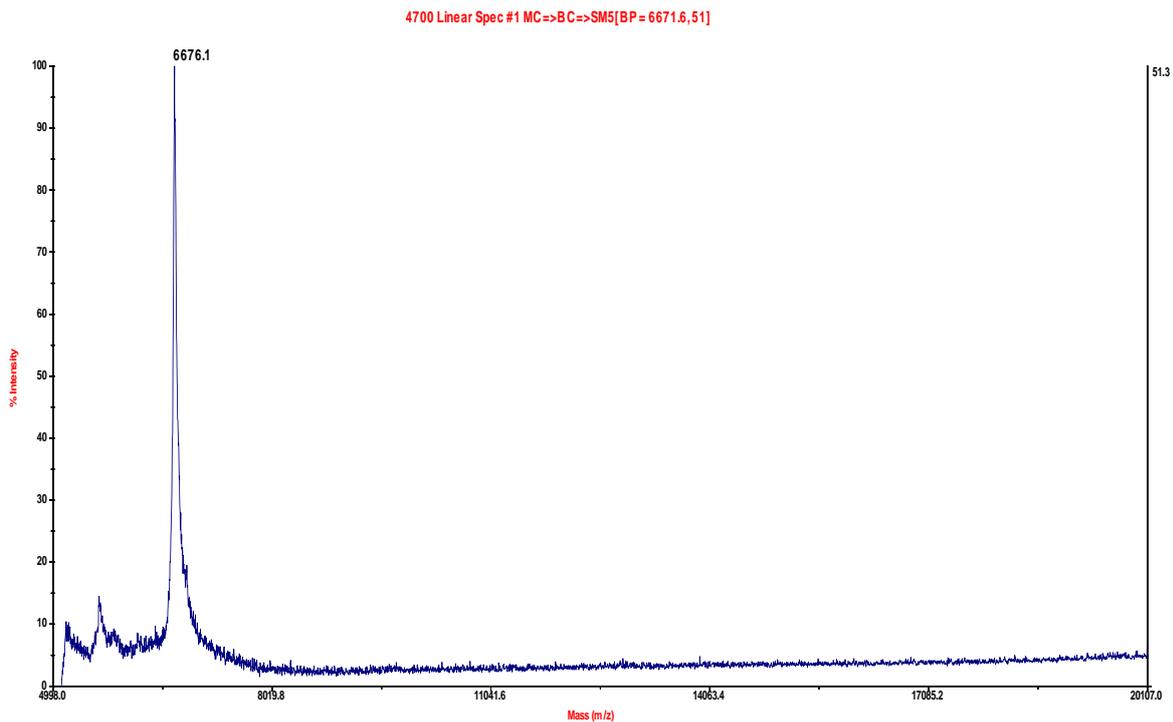


Figura 22. Espectro de masa obtenido en modo lineal positivo (seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente) .Rango m/z 5000-20000.

Debido a que el gel de la figura 21A podría sugerir que la banda cercana a 20 KDa correspondería a la tiorredoxina mientras que por espectrometría de masa solo se detecto la presencia de la defensina, se podría llevar a cabo un Western Bolt con anticuerpo anti-trx para determinar o no la presencia de la misma.

Ya que la digestión en solución con 0.5 UE/ μ L incubada por 24 horas mostró una disminución importante de digestión parcial, en comparación con la misma llevado a cabo en columna con 1 UE/ μ L ON a TA, se probó realizar una nueva digestión en columna (E3) con 0.5 UE/ μ L, dejándola actuar por 48 horas de las cuales 24 fueron realizadas bajo agitación para mejorar el contacto entre la enzima y sus sitios de corte en el péptido Trx-EcgDf1-His6. Por lo observado en la figura 23, pareciera que la digestión no fue completa (muestras L2a-c). Pero también se podría pensar que la banda que estamos suponiendo que corresponde a la proteína de fusión, no fuera tal, sino un trímero de la defensina que quedaría aproximadamente del mismo peso molecular. Para determinar si las muestras donde se llevó a cabo las digestiones cuentan solo con el péptido de interés o una mezcla con el péptido de fusión, se llevó a cabo el estudio de las mismas por espectrometría de masas MALDI-TOF, resultados que aun se aguardan. También se podría identificar la proteína de interés mediante Western Blot con anticuerpos anti-His6 o anti-Trx conjugados a un fluoróforo.

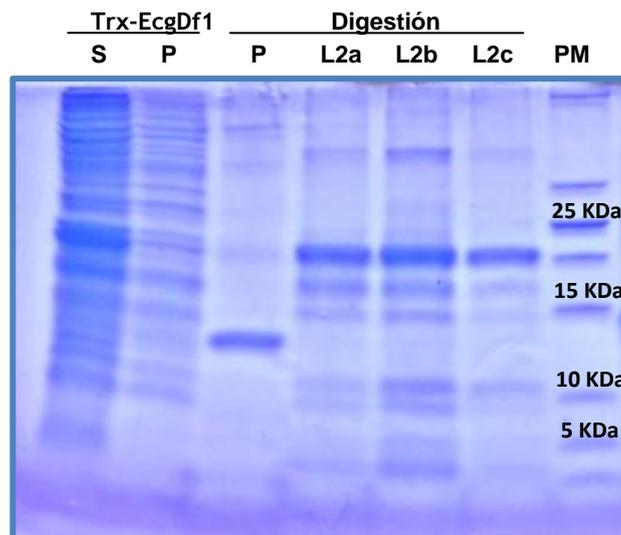


Figura 23. Purificación del péptido recombinante tiorredoxina-EcgDf1 en columna en batch. Electroforesis SDS-PAGE (15%) tris-tricina.; Trx-EcgDf1 S: fracción soluble de la expresión del producto. Trx-EcgDf1 P: Percolado.; Digestión P: Percolado; L2a-c: lavado con buffer de lisis conteniendo 300 mM imidazol. En cada carril se sembraron 10 μ L. PM: Marcador de peso molecular 100 KDa (ThermoFisher).

De confirmarse que las bandas próximas a 20 KDa en las muestras L2a-c corresponden a Trx-EcgDf1-His6, podríamos pensar que el péptido de fusión unido a la resina no se encuentra lo suficientemente extendido para que la enzima la pueda clivar. Esto se podría solucionar dejándole algún aminoácido de más por detrás del sitio de corte de la enteroquinasa si se quisiera realizar la digestión en columna, de lo contrario aunque sea más tediosa la digestión en solución con la posterior purificación de la defensina es lo más conveniente y efectivo para este tipo de péptido.

3.5 Cuantificación péptido recombinante

El péptido EcgDf1-His6 obtenido en cada ensayo se cuantificó con el método de Bradford. Se escogió este método debido a la ausencia de aminoácidos triptófano y tirosina en la defensina lo cual no permite su cuantificación por absorbancia a 280 nm, mientras que si posee los aminoácidos básicos (especialmente arginina) que detecta Bradford, a demás de ser un método más sensible lo cual lo convierte en el método más adecuado para su cuantificación. La figura 24 muestra la curva de calibración obtenida por el método de Bradford y la ecuación utilizada para el cálculo de la concentración proteica

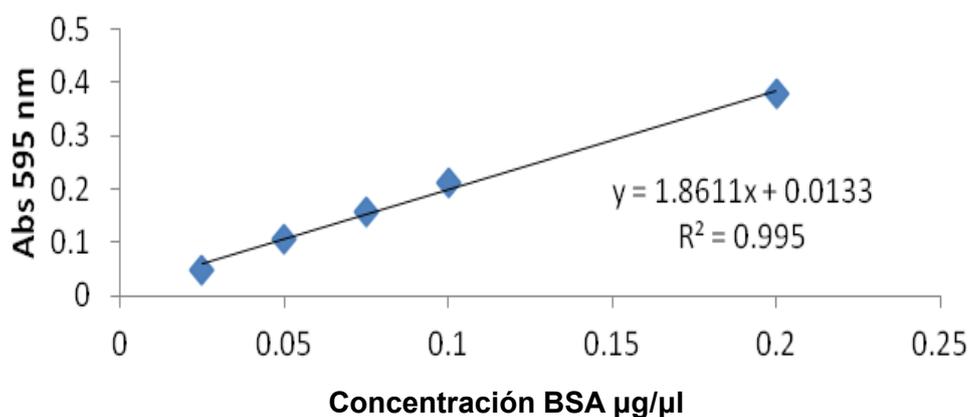


Figura 24. Curva de calibración realizada con los estándares de seroalbúmina bovina (BSA) utilizada para la determinación de concentración proteica por el método de Bradford. Cada concentración de estándar se analizó por duplicado, al igual que las muestras problemas.

Tabla II. Tabla de rendimientos

	E1		E2B
	Trx-EcgDf1-His6	EcgDf1-His6	EcgDf1-His6
Concentración (µg/µL)	0.083	0.120	0.010
Rendimiento (µg/g células)	297.5	72.5	67.3

Para E1 a partir de 200 mL de medio de cultivo y 1 gr de pellet de células se obtuvo 297.5 μg de Trx-EcgDf1-His6, del cual 99.2 μg correspondería al péptido Ecg-Df1-His6. Durante la etapa de purificación se perdió 26.5 μg de defensina, llegando a un rendimiento de 72.5 $\mu\text{g/g}$ células.

Ensayo 1 (E1): Trx-EcgDf1-His6 0.083 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ A partir de 200 mL de medio de cultivo y 1 gr de pellet de células se obtuvo 297.5 μg de Trx-EcgDf1 y 72.5 μg de Ecg-Df1.

Ensayo 2 (E2): EcgDf1-His6 0.0103 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ A partir de 400 mL de medio de cultivo y 2.6 gr de pellet de células se obtuvo 41 μg de EcgDf1. 134 μg es lo que perdimos.

Inesperadamente, en presencia de tiorredoxina las medidas de Bradford son equivalentes antes y después de dializar y liofilizar, mientras que en ausencia de Trx, las medidas de EcgDf-His6 varían, prácticamente no se detecta por Bradford luego del proceso de liofilizado. Esto puede deberse a que luego de liofilizar la defensina adopta una conformación donde los aminoácidos que detecta el reactivo de Bradford (arginina y lisina) quedan internamente y no puedan ser detectados.

3.6 Ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de Trx-EcgDf1-His6 y EcgDf1-His6 frente a diversos patógenos se realizó por MIC (concentración inhibitoria mínima, Tiozzo *et al.*, 1998) en un sistema en placa de microtitulación (Broekaert *et al.*, 1990). La actividad antimicrobiana de las defensinas de plantas se ha observado principalmente contra hongos pero también contra algunas bacterias, especialmente Gram positivas.

El péptido fue desafiado con diferentes microorganismos:

- Bacterias *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*), bastón Gram positivo patógeno de plantas, que infecta al tomate y causa cancro (Gartemann *et al.*, 2003); *Staphylococcus aureus*, coco Gram positivo patógeno versátil capaz de causar una amplia gama de enfermedades en humanos; *Xanthomonas versicatoria*, bastón Gram negativo, causante de la mancha foliar bacteriana en diversas frutas y verduras;
- Hongos Ascomycotas filamentosos *Aspergillus niger*, patógeno de cebolla (Hayden *et al.*, 1992) y responsable de infecciones pulmonares en pacientes inmunocomprometidos e infecciones de oído (Schuster *et al.*, 2002); *Botrytis cinerea*, patógeno de muchas especies vegetales y animales aunque su hospedador económicamente más importante es la uva; *Cochliobolus sativus* responsable de una de las enfermedades foliares más importantes de la cebada, la mancha borrosa, por las mermas en rendimiento y calidad que la misma puede causar (Gamba & Estramil, 2012); *Penicillium expansum*, patógeno que puede causar enfermedades severas después de la cosecha de los frutos, es el principal causante de la putrefacción de manzanas y peras, además de considerarse como el principal productor de una micotoxina, la patulina, que se encuentra comúnmente en las manzanas podridas (He *et al.*, 2011).

En cada ensayo se enfrentó un microorganismo a diferentes concentraciones del péptido y se incluyó un control de crecimiento del microorganismo (medio, suspensión de bacterias/esporas y agua), un control negativo sin microorganismos y un control con un antimicrobiano conocido.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad preliminares con Trx-EcgDf1-His6 contra *Cmm*, y *A. niger* (se detallan en las secciones siguientes) y con la defensina purificada y clivada con enteroquinasa en solución (E1: sección 3.4.1, figura 19, muestra EcgDf1 Purif), contra las bacterias *S. aureus* y *X. versicatoria* y contra los hongos *A. niger*, *B. cinérea*, *C. sativus*

y *P. expansum*. El péptido recombinante defensina no mostró actividad inhibitoria frente a los patógenos *S.aureus*, *X.versicatoria* y *P. expansum* en un rango de concentraciones de $2.98 - 1.95 \times 10^{-3} \mu\text{M}$. Los ensayos cualitativos con los hongos probados (Figura 25A-B) mostraron actividad sobre *A. niger*, *B. cinerea* a una concentración mínima de $2.98 \mu\text{M}$. Inclusive comparando con el control de crecimiento se puede ver cierto poder de inhibición de crecimiento para las diluciones siguientes en ambos patógenos.

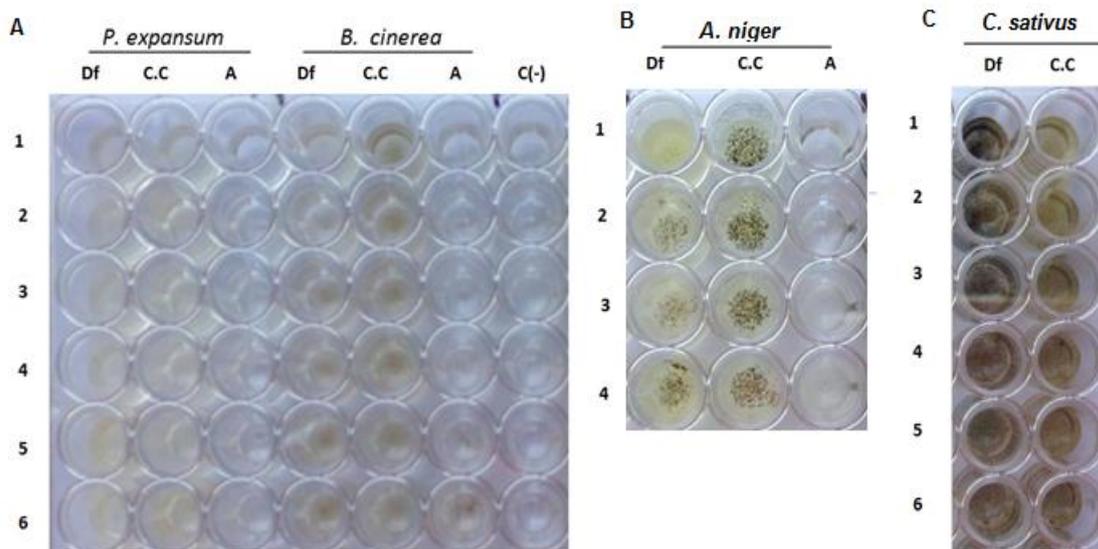


Figura 25. Ensayo MIC del péptido recombinante EcgDf1-His6 frente a distintos hongos. Sistema en placa de microdilución. **A) *B. cinerea*; B) *A.niger*; C) *C. sativus*** Df 1-6: Diluciones seriadas a partir de $2.98 \mu\text{M}$ de péptido EcgDf1-His6, medio de cultivo y suspensión de esporas; **C.C:** Control de crecimiento; **A:** Control de inhibición, Propiconazol 0.125 mg/mL .

Para *C. sativus* con todas las concentraciones ensayadas de defensina desde la máxima concentración hasta la dilución 1/10 incluida se observa un aumento de la esporulación del hongo en comparación con el control de crecimiento (Figura 25C). Una posible explicación podría ser que el péptido EcgDf1-His6 estuviera desencadenando un suceso de estrés al microorganismo, provocando una respuesta que involucra un aumento en la esporulación del hongo. En este caso, sería necesario medir el desarrollo del micelio en el período previo a la esporulación.

Una vez confirmado que EcgDf1-His6 mostraba actividad en los ensayos preliminares se realizaron ensayos posteriores contra la bacteria *Cmm* y los hongos *A. niger* y *B. cinerea*, contra la defensina clivada y purificada en columna (E2b: sección 3.4.2, figura 21A, muestra D1) donde se realizaron replicas, donde se pudo realizar un análisis cuantitativo a demás de cualitativo.

3.6.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Contra *Cmm* se testeó la capacidad inhibitoria del a) péptido de fusión Trx-EcgDf1-His6 (E1), b) mezcla de defensina clivada y *carrier* digerido sin purificar (E1: sección 3.4, figura 19, muestras D1-D3) y por último c) la defensina recombinante (según resultado MALDI-TOF) (E2b). La idea de evaluar la actividad de esta forma es, además de verificar si la defensina en estudio inhibe el crecimiento de *Cmm*, ver cómo incide la tiorredoxina fusionada. Se espera que el producto final (defensina purificada) muestre mayor actividad antimicrobiana que la misma formando parte de la proteína de fusión. Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla III.

El péptido de fusión muestra actividad antimicrobiana contra *Cmm* a una concentración de 1.38 μM , única concentración a la que se observa una disminución significativa de la turbidez con respecto al control de crecimiento, con un porcentaje de inhibición del 63,6%. El péptido EcgDf1-His6 separado de la tiorredoxina (mezcla sin purificar), tiene una actividad mayor que fusionado a Trx, 1.18 μM inhibe 78.0% y la dilución siguiente 0.59 μM muestra un porcentaje de inhibición del 26.0%. Se verifica entonces que la Trx interfiere en la plena actuación del AMP, provocando una disminución en la actividad del péptido en comparación al péptido clivado. Cuando se enfrentó EcgDf1-His6 libre de tiorredoxina se observó disminución de turbidez a concentraciones de 1.49 y 0.745 μM con 100% de inhibición del crecimiento. La inhibición observada con 0.373 μM probablemente no sea significativa. Se comprobó que la eliminación del *carrier* a una concentración muy similar de Trx-EcgDf1-His6 y Ecg-Df1-His6, lleva a un aumento considerable de la actividad frente a *Cmm*.

Tabla III. Resultados ensayos de actividad frente a *C. michiganensis ssp michiganensis*

Trx-EcgDf1-His6 recombinante (E1)

Concentración Trx-EcgDf1 (μM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.38	63.6
0.692	0

Trx + EcgDf1- His6 clivada sin purificar (E1)

Concentración Trx + EcgDf1-His6 (μM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.18	78.0
0.590	26.0
0.295	0

EcgDf1-His6- recombinante (E2b)

Concentración EcgDf1-His6 (μM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.49	100 ± 4E ⁻¹
0.745	100 ± 4E ⁻¹
0.373	4.56 ± 1E ⁻¹
0.186	0

3.6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Aspergillus niger*

La actividad frente a *A. niger* se evaluó con la proteína de fusión Trx-EcgDf1-His6 (E1) y el péptido EcgDf1 (E2b). En la figura 26A se muestra los resultados con Trx-EcgDf1-His6, donde claramente se puede ver una disminución significativa de la turbidez en las tres concentraciones mayores, 1.49, 0.745 y 0.373 μM con porcentajes de inhibición de 64.3, 26,4% y 7,16% respectivamente (Tabla VIa)

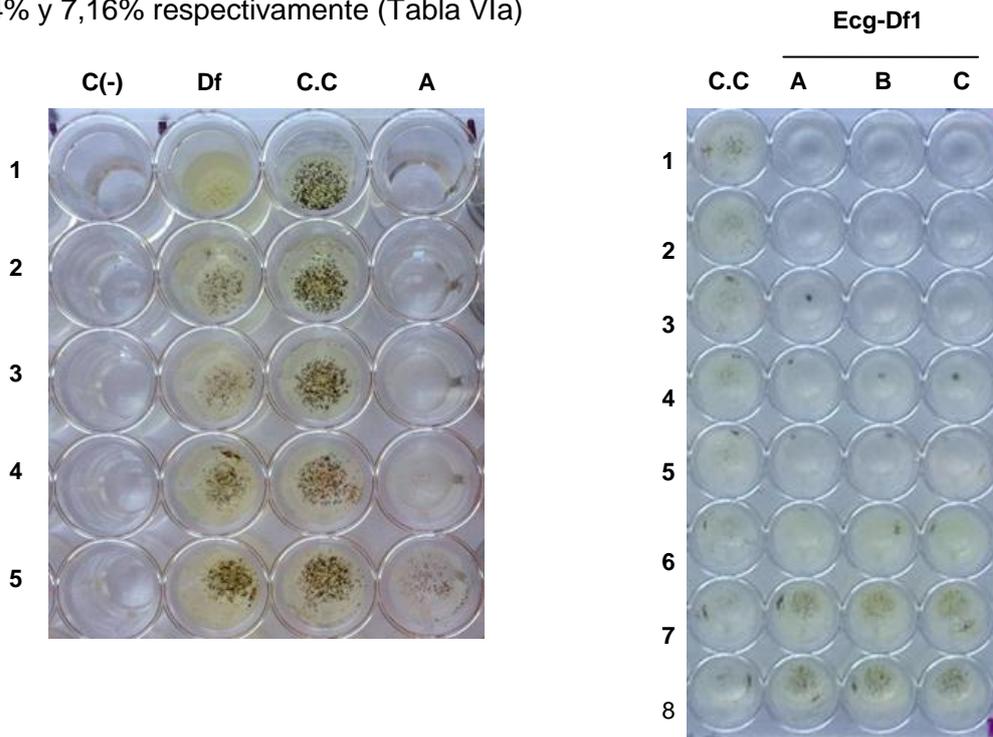


Figura 26. A) Ensayo MIC del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 frente a *A. niger*. C(-): Control negativo. Df 1-5: Diluciones seriadas péptido Trx-EcgDf1-His6 en PDA y suspensión de esporas. C.C: Control de crecimiento. A: Control de inhibición, Propiconazol 0.125 mg/mL. **B) Ensayo MIC del péptido recombinante EcgDf1-His6 frente a *A. niger*.** Sistema en placa de microdilución. A, B, C 1-8: Diluciones seriadas péptido EcgDf1-His6 en PDA y suspensión de esporas. C.C: Control de crecimiento.

Tabla VI. Resultados ensayo de actividad Trx-EgcDf1-His6 y EgcDf1-His6 frente a *A. niger*

a) Trx-EgcDf1-His6 recombinante (E1)

Concentración Trx-EgcDf1-His6 (µM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.38	64.3
0.692	26.4
0.346	7.16
0.173	0
0.086	0

b) EgcDf1-His6 recombinante (E2b)

Concentración Trx + EgcDf1-His6 (µM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.49	99.5 ± 1.2
0.745	98.4 ± 1.2
0.373	76.9 ± 1.4
0.186	35.8 ± 1.7
0.093	53.4 ± 1.4
0.047	12.8 ± 2.0
0.023	0

Cuando se probó la actividad de la Defensina purificada contra este hongo, se observó una clara disminución del crecimiento en todos los pocillos a excepción de las dos últimas diluciones en comparación con el control de crecimiento (Figura 26B). Los resultados cuantitativos (Tabla VIb) con los cuales se determinaron los porcentajes de inhibición son acordes con lo observado. A pesar de que ambos ensayos no fueron llevados a cabo en paralelo se muestra nuevamente la tendencia del efecto negativo de la Trx sobre la actividad del péptido EgcDf1-His6. Se esperaba tener un aumento considerable de la actividad como la reportada por Kovaleva y colaboradores (2011) que se encontraron con una proteína de fusión de tipo defensina que no era biológicamente activa hasta que escindieron el péptido y obtuvieron como resultado una fuerte actividad antifúngica frente a una variedad de hongos patógenos. En este caso el péptido de fusión siempre mostró actividad contra *A. niger* pero la misma se potenció notablemente a menores

concentraciones cuando se le removió el *carrier*, alcanzando casi el 100% de inhibición de crecimiento a una concentración de 0.745 μM , un poco más de la mitad de concentración de Trx-EcgDf1-His6 para el cual se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (1.38 μM con 64.3%).

Como se mencionó anteriormente, los hongos son más sensibles a las acciones de los péptidos antimicrobianos de clase defensinas que las bacterias, Cuando comparamos la actividad del péptido de fusión contra *A. niger* con la actividad mostrada frente a *Cmm*. los porcentajes de inhibición para la máxima concentración (1.38 μM) son muy similares (63.6 % para *Cmm* y 64.3% para *A. niger*), sin embargo, el péptido de fusión solo mostró actividad únicamente para el máximo de concentración ensayada contra *Cmm*, mientras que frente a *A. niger*, se vio cierto poder de inhibición hasta la segunda dilución seriada de la máxima concentración evaluada (0.346 μM) (Figura 27). Este resultado no fue sorpresa ya que otros investigadores realizaron ensayos de actividad con defensinas de plantas sin clivar el péptido de fusión exhibiendo actividad antifúngica contra los fitopatógenos ensayados (Alem *et al*, 2002).

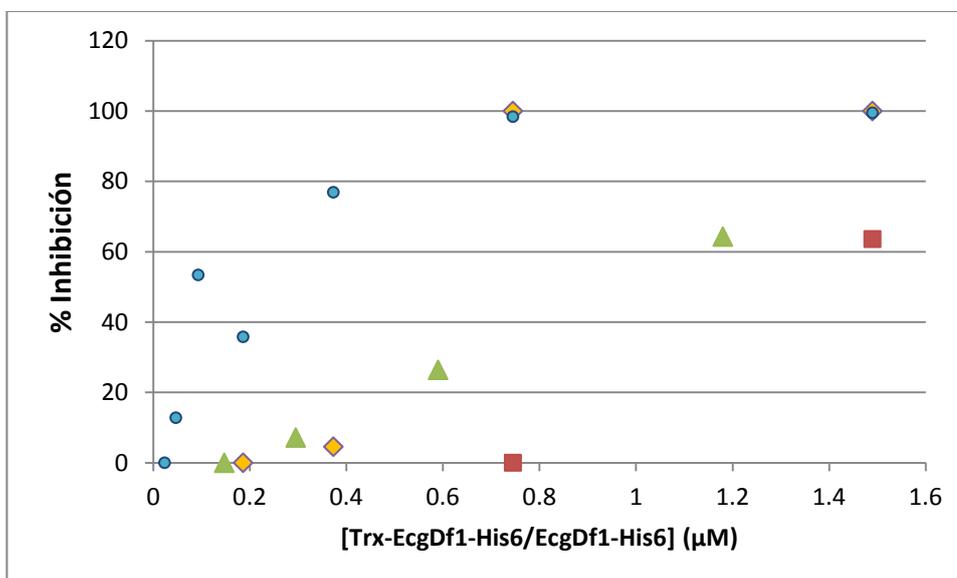


Figura 27. Curva de porcentajes de inhibición en función de la concentración del péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 y EcgDf1-His6 contra *A. niger* y *Cmm*. En azul EcgDf1-His6 y en verde Trx-EcgDf1-His6 frente a *A. niger*; En amarillo EcgDf1-His6 y en rojo Trx-EcgDf1-His6 frente a *Cmm*.

3.6.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Botrytis cinerea*

Cuando se valoró la actividad antimicrobiana de la Defensina contra este patógeno de importancia agronómica, se observó una inhibición de crecimiento de *B. cinerea* en todas las diluciones ensayadas (Figura 28).

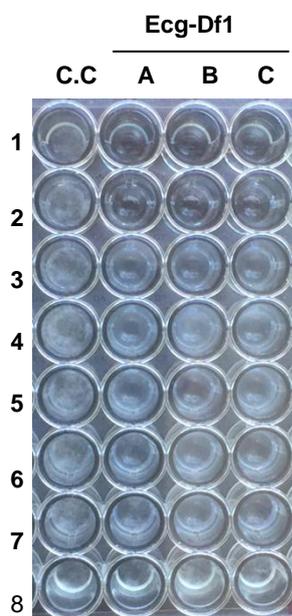


Figura 28. Ensayo MIC del péptido recombinante EcgDf1-His6 frente a *B. cinerea*. Sistema en placa de microtitulación. A, B, C 1-8: Diluciones seriadas péptido EcgDf1-His PDA y suspensión de esporas. C.C: Control de crecimiento.

Tabla V. Resultados ensayo de actividad EcgDf1-His6 frente a *B. cinerea*.

EcgDf1-His6 recombinante (E2b)

Concentración Trx-EcgDf1 (µM)	Porcentaje de Inhibición (%)
1.49	97.5 ± 1.5
0.745	97.5 ± 1.5
0.373	48.7 ± 1.7
0.186	43.4 ± 1.7
0.093	40.3 ± 1.8
0.047	26.1 ± 2.1
0.012	26.7 ± 2.1

El péptido EcgDf1-His6 contra los tres microorganismos: *Cmm*, *A. niger* y *B. cinerea* provocó porcentajes de inhibición máximos muy similares (100%, 99.5% y 97.5% respectivamente) para la máxima concentración de EcgDf1-His6 ensayada (1.49 μ M). Sin embargo, a una concentración de 0.373 μ M, la defensina causó una disminución del crecimiento del 76.9% para *A. niger*, mientras que el porcentaje de inhibición para *B. cinerea* fue del 48.7 % (Figura 29). A esa misma concentración la defensina prácticamente no inhibe el crecimiento de *Cmm*, por lo que parecería que este péptido es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *A. niger* que del hongo *B. cinerea* y la bacteria *Cmm*. De cualquier manera se destaca que para las dos concentraciones menores ensayadas, EcgDf1 mantiene cierto porcentaje de inhibición para *B. cinerea* pero no para *A. niger*. Los mecanismos de acción del péptido podrían ser diferentes para estos tres patógenos.

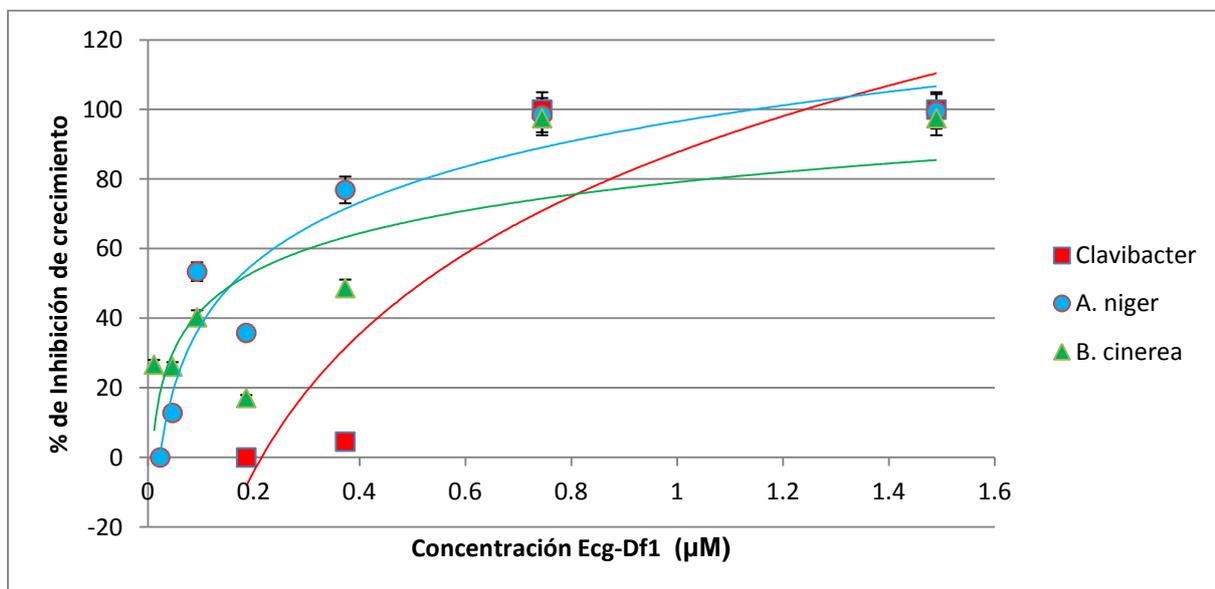


Figura 29. Actividad de EcgDf1-His6 clivada y purificada en columna contra los microorganismos ensayados. En azul EcgDf1-His6 frente a *A. niger*; en verde EcgDf1-His6 frente a *B. cinerea*; en rojo EcgDf1-His6 frente a *Cmm*.

Tabla VI. Resultados 50% de inhibición de crecimiento de patógenos

Microorganismo	Concentración EcgDf1-His6 (μ M)
<i>Cmm</i>	>0.373
<i>A. niger</i>	~0.093
<i>B. cinerea</i>	~0.373

4 Conclusiones

En el presente trabajo se caracterizó la actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos de la defensina EcgDf1, un AMP de la especie nativa ceibo (*Erythrina crista-galli*), producido heterológamente en *E. coli*.

La región codificante para el péptido maduro EcgDf1 se clonó en el vector pET 102 en fase con la tiorredoxina y la etiqueta His6 para facilitar su expresión y purificación. En todas las condiciones evaluadas (cepas *E. coli* Rg y BL21; tiempo post-inducción 4 y 24 hs; temperatura post-inducción 20°C y 28°C) se obtuvo péptido recombinante Trx-EcgDf1-His6 en la fracción soluble. Entre las condiciones evaluadas, se observó un mayor rendimiento en la fracción soluble con *E. coli* Rosetta-gami a 28°C y 24 horas post-inducción.

La digestión y purificación del péptido recombinante con 0.5 UE/ μL en solución fue total y se confirmó la presencia del péptido EcgDf1-His6 por espectrometría de masas. La misma llevada a cabo en columna, presenta bandas adicionales que pueden deberse a digestión parcial o a la formación de otras conformaciones (trímero). El análisis de las bandas adicionales por MALDI-TOF (en curso) aportará una respuesta.

Respecto a la actividad antimicrobiana del péptido recombinante, Trx-EcgDf1-His6 muestra actividad contra los patógenos *Cmm*, y *A. niger*. Se vio el efecto del *carrier*, tiorredoxina sobre la actividad de EcgDf1-His6, la misma disminuye mientras esté unido a la Trx. La defensina purificada, mostró una alta eficacia antimicrobiana contra *A. niger*, *B. cinerea* y *Cmm*, para los cuales mostró un 100% de inhibición de crecimiento a una mínima concentración de 0.745 μM de EcgDf1-His6 para estos tres patógenos de importancia agronómica. Estos valores fueron mucho más bajos que los observados para otros AMPs producidos de forma recombinante como los observados por Lacerda y sus colaboradores o los péptidos sintéticos obtenidos Larrañaga y colaboradores los cuales observaron que se alcanzó el 90% de inhibición de crecimiento del patógeno *A. niger* a una concentración mínima de 1.28 μM de péptido. Mientras que para *S. aureus* y *X. versicatoria* el péptido EcgDf1-His6 no mostró actividad inhibitoria a las concentraciones ensayadas. EcgDf1-His6 mostró una alta eficacia antimicrobiana contra los patógenos.

Con este trabajo de logro aportar a la caracterización de *EcgDf1* y es un avance hacia la obtención de un producto biotecnológico de utilidad en el control de patógenos, a partir de una especie nativa de nuestro país.

5 Perspectivas

En primer lugar, para completar la caracterización de la actividad antimicrobiana de este péptido antimicrobiano, se podría estudiar el efecto de la misma una vez que se remueve la etiqueta de afinidad (HisTag). Como se ha citado anteriormente, hay resultados que muestran un aumento de la actividad del péptido recombinante al eliminar esta secuencia. La misma puede llevarse a cabo sin inconvenientes gracias a la presencia del sitio de corte para el factor Xa. Esto sería de relevancia sobre todo para las concentraciones más diluidas. Además debido al potencial de este tipo de péptidos para el control de patógenos, es valioso realizar nuevos ensayos de actividad antimicrobiana sobre una amplia variedad de patógenos de cultivos, y de importancia en medicina, y comparar su actividad antimicrobiana contra antibióticos y fungicidas comerciales. De mostrarse mejores resultados que los fungicidas actuales sería necesario llevar a cabo un escalado para realizar un mayor número de pruebas *in vivo* y ensayos de inocuidad.

También sería interesante realizar un seguimiento al microscopio para determinar si hay efectos visibles en desarrollo de formación de estructuras características en el caso de los hongos, como por ejemplo de conidióforos. Para las bacterias ensayadas se buscaría aglomeración de las mismas en presencia de la defensina. Además sería muy útil tomar muestras a diferentes tiempos del hongo *C. sativus* luego de la adición de esta clase de péptidos para poder dilucidar mediante análisis microscópico que está sucediendo, si efectivamente la defensina actúa como un estímulo/estrés en las condiciones ensayadas provocando un aumento en la esporulación del hongo en comparación con el control sin tratar, pudiendo profundizar más sobre el modo de acción que poseen estos tipos de péptidos.

Finalmente sería de interés, realizar un estudio sobre el mecanismo de acción de este péptido, analizando si el mismo sólo interacciona con la membrana de los patógenos o se internaliza y lleva sus acciones sobre un blanco intracelular. El mismo se podría realizar a través de la utilización de colorantes comerciales que permiten determinar si se produce una desestabilización de la membrana plasmática. También se podría marcar la defensina a una sonda fluorescente, lo que permitirá detectar su internalización a través de microscopia de fluorescencia. Otra opción sería fusionar EcgDf1 a la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), no solo con el objetivo de determinar su localización, sino para ver el potencial como vector para llevar moléculas al interior celular, aunque la GFP podría obstaculizar la entrada debido a su gran tamaño. Además para las muestras donde se

obtuvo el 100% de inhibición de crecimiento, si EcgDf1-His6 posee efecto como bacteriostáticos o bactericidas sobre los patógenos, a través de simplemente plaquearlas en el medio de crecimiento correspondiente.

6 Materiales y Métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Medios de cultivo

Agar Nutriente:

28 g de agar. Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Medio Luria-Bertani (LB):

10 g bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 7. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C). Para cultivo sólido se agrega 1.5% de agar.

Ampicilina: 50 µg/mL. Stock= 100 mg/mL

Medio Potato-Dextrose-Broth (PDB) Difco™

Medio Tryptone-Soya- Broth (TSB) Thermo Scientific™

Medio Tripteina-Soya-Agar (TSA)

30 g de TSB Thermo Scientific™ y 20 g de agar. Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 7,3. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Medio SOB:

20 g de bacto- triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl. Se lleva 950 mL con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 1 L con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Medio SOC:

A 10 mL de SOB esterilizado y enfriado a menos de 60°C se le agregan 50 µL de MgCl₂ (2M) y 200 µL glucosa (1M).

6.1.4 Primers

Secuencias (5´ - 3´) de *primers* empleados para clonado y expresión de gene *EcgDf1*

Foward	TCCGGTGATGACGATGACAAGAGAACATGCGAGTCTCAAAGC
Reverse	GGATCAAACCTCAATGGTGATGGTGATGATGCCTTCCCTCGATACAGTGTGGTGCAGAAGCAT

6.2 Métodos

6.2.1 Técnicas empleadas con ADN

6.2.1.1 Subclonado por *restriction-free cloning*

Obtención megaprimer (Primera RF PCR)

La PCR se realiza en un volumen final de 50 µL con 10 µL de buffer de Taq polimerasa (5X), 5,0 µL de dNTPs (10 mM) (Promega), 2,5 µL de cada primer (5 µM), 0,4 µL de Taq polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific) y 1 µL de de ADN plasmídico pGEM-Teasy que contiene el ADNc de *EcgDf1*. La reacción se lleva a cabo (termociclador Corbett (CG1-96)) utilizando un programa de: 1 minuto a 98°C y 25 ciclos de 30 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C, 40 segundos a 60°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se verifican por electroforesis en agarosa.

Purificación amplicón por gel

En primer lugar se corren los productos de PCR en gel de agarosa para escindir las bandas y purificarlas. Las bandas se cortan en trozos y se introducen en minicolumnas Wisard (Promega), se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realiza la precipitación con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. Luego se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 13000 rpm, se lava con 1 mL EtOH 70 y se centrifuga 15 minutos a 4°C a 13000 rpm. El pellet se seca y se resuspende en 10-20 µL de agua mQ. Se cuantifico ADN mediante espectrofotometría (Nanodrop).

Amplificación de ADN EcgDf1-pET102 (Segunda RF PCR)

El producto purificado resultante de la primer RF-PCR se utiliza como único primer (megaprimer) en una segunda reacción de PCR en un volumen final de 50 μ L con 10 μ L de buffer de Taq polimerasa (5X), 5,0 μ L de dNTPs (10 mM) (Promega), 7,0 μ L de megaprimer (~100 ng), 0,4 μ L de Taq polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific) y 1 μ L de ADN plasmídico pET-102 (~20 ng). La reacción se lleva a cabo (termociclador Corbett (CG1-96)) utilizando un programa de 1 minuto a 98°C y 30 ciclos de 30 segundos a 98°C, 40 segundos a 60°C, 4 minutos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se incluyeron dos blancos, uno sin *megaprimer* y otro sin plásmido pET-102. Los productos de amplificación se verifican por electroforesis en agarosa.

Digestión con DpnI

El vector parental es digerido en un volumen final de 20 μ L con 1 μ L de DpnI (20 U/ μ L), 2 μ L de buffer y 10 μ L del producto de la segunda RF-PCR durante 2 horas a 37°C. El volumen total de la digestión se precipita con ARN-t y se transforma mediante electroporación células Top 10 de *E. coli* según protocolos descritos a continuación. Se realiza ésta misma digestión para el control sin *megaprimer*.

Precipitación con ARN-t del plásmido sintetizado por RF-cloning

La mezcla de precipitación se realiza con 10 μ L del producto de digestión, 10 μ L de ARN-t (0,2 μ g/ μ L) (Invitrogen), 20 μ L de H₂O mQ y 100 μ L de EtOH absoluto. Se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a 4°C. El pellet se lava con 200 μ L de EtOH 70% y se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a 4°C, se deja secar y se resuspende en 2 μ L de H₂O mQ.

Transformación de células de *E.coli* mediante electroporación

Para llevar a cabo un proceso de transformación mediante electroporación (equipo MicroPulser™ BIO-RAD) en primer lugar se descongelan las células en hielo y se agregan a la digestión precipitada con ARN-t. Se transfiere la mezcla a la celda (0,2 cm), se electropora (modo Ec2) y se agrega 1 mL SOC. Los parámetros de pulso deben ser de aproximadamente 5 milisegundos y entre 2,5 y 3 KV. La mezcla de transformación se incuba con agitación durante 1 hora a 37°C. Se plaquea 1/10 Y 1/2 de producto de digestión con Dpn1 (con y sin *megaprimer*) en placas de LB ampicilina y se incuba a 37°C no más de 20 horas.

Extracción de ADN plasmídico

Para realizar la extracción de ADN plasmídico se realizan minipreparaciones partiendo de un cultivo de cada colonia aislada en 3 mL de LB ampicilina incubado toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se centrifugan 1,5 mL a 12000 rpm durante 2 minutos y se agregan 100 µL de solución I (mezclar con vortex) se incuba 5 minutos en hielo, 200 µL de solución II mezclando por inversión e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente y 150 µL de solución III mezclando por inversión y dejándolo 15 minutos en hielo. Se centrifuga durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se recupera el sobrenadante. La precipitación se realiza con 1 mL de absoluto a temperatura ambiente y se centrifuga inmediatamente durante 15 minutos a 12000 rpm. Se descarta sobrenadante. Se prepara 1 mL de TE con µL RNAsa (10 mg/mL) y se añade 50 ul a cada tubo. Se incuba durante 5 minutos a 37°C, se solubiliza el pellet y se incuba por 10-15 a 37°C. Se agrega 30 µL PEG20% NaCl 2,5 M se (agitar) y se deja durante 1 hora en hielo. Luego se centrifuga durante 15-20 minutos a 12000 rpm, se descarta sobrenadante y se lava con 500 µL de EtOH 70%. El pellet obtenido se resuspende en 30 µL de agua mQ.

TE: 10 mM Tris-HCl pH7.6 y 1 mM de EDTA pH8

Solución I: 10 Mm EDTA pH8 y 25 mM Tris-HCl pH8

Solución II: 1% SDS y 0,2 M de NaOH

Solución III: 60mL de KAc 5M, 11,5 mL de HAc glacial y 28,5 mL de H₂O

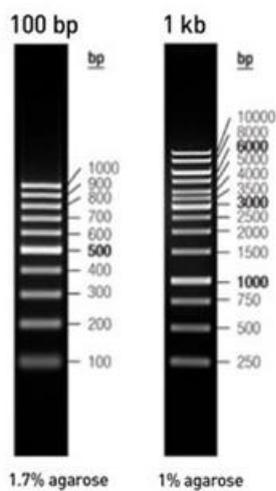
6.2.1.2 Electroforesis de ADN

Para visualizar los productos de amplificación se realiza electroforesis en gel de agarosa 1,7 % o 1,2% (según tamaño del producto) en buffer TBE 0,5x con 0,5 µg/mL de GoodView®. Las muestras se siembran con ayuda del buffer de carga 5x. La corrida se realiza a 100 V durante 20-40 minutos. Como referencia se siembra un marcador de peso molecular (6 µL)

Buffer Tris Borato (TBE) (10X): 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0.5 M (pH=8) en 1L de agua destilada.

Buffer de carga (5x): 0,25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua.

Marcador de peso molecular Plus 100 pb y 1 Kb (Thermo Scientific)



Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría (nanodrop)

Se cuantificó el ADN resultante de la primer RF-PCR mediante espectrometría (equipo Genova Nano *Jenway*)

6.2.1.3 Producción de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21/Rg

A partir de un pre cultivo inoculando 10 mL de LB-Ampicilina con una colonia de la cepa *E. coli* BL21/Rg transformada con el plásmido de expresión más secuencia de interés (pET102::Trx-EcgDf1). Paralelamente se siembran controles Rg y BL21 con plásmido sin el inserto de interés. Se deja incubar *overnight* (ON) a 37°C bajo agitación a 150 rpm. Se inocula por duplicado 10 mL de LB-Ampicilina, con 500 µL de precultivo. Los cultivos se mantienen a 37°C y 150 rpm hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0.6-0.7. Alcanzada la DO_{600nm} óptima, una mitad del cultivo se le induce la expresión del gen *EcgDf1* con IPTG (1 mM final) bajo agitación a 150 rpm a 21°C y 28°C, tomando alícuotas a las cuatro y veinticuatro horas post inducción para determinar el mejor rendimiento en la fracción soluble. Finalizada la inducción, los cultivos se centrifugan a 4°C a 4000 g durante 15 minutos, se descartan los sobrenadantes y se determina los gramos de células húmedas obtenidas por volumen de cultivo. Se prosigue con la lisis celular resuspendiendo el pellet de células suavemente con 2 mL de buffer de lisis. La sonicación se realiza en hielo aplicando 4 ciclos de 15 segundos cada uno a 30% de amplitud, con intervalos de 1 minuto de descanso entre cada ciclo. Se procede a centrifugar a 9.6 g durante 10 minutos a 4°C y se separa la fracción soluble de la insoluble, guardar alícuotas de ambas fracciones para electroforesis de proteínas. El sobrenadante se almacena hasta el momento que se procedió con la purificación por cromatografía de afinidad. Luego se procede a determinar las condiciones (temperatura y tiempo post-inducción) más efectivas para la obtención del péptido recombinante en la fracción soluble mediante visualización en geles de poliacrilamida 15% tris-glicina. Una vez determinadas estas condiciones se procede a un escalado partiendo de cuatro cultivos de 100 mL. En esta oportunidad se procede a hacer dos lavados al pellet de las células sonicadas uniéndolos a la fracción soluble.

Buffer de lisis: 20 mM Tris-HCl pH=8, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol y 10 % glicerol en agua.

6.2.2 Técnicas empleadas con proteínas

6.2.2.1 Purificación por cromatografía de afinidad (IMAC-CU⁺²)

Preparación de la matriz

Se colocó 2 mL de la matriz comercial “chelating sepharose” (General Electric) en una columna PD-10 vacía a la cual se le pasa 3 volúmenes de columna (VC) de 50 mM CuSO₄. Para eliminar el exceso de metal se lava la matriz con 3 VC de agua destilada y 3 VC de buffer de lisis (frio).

Inmovilización y elución de las proteínas

El sobrenadante de lisis obtenido de la expresión de EcgDf1 en *E.coli* Rg se mezcla con la matriz cargada de cobre y se deja en batch durante 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo se procede a eluir el percolado, y luego se lava con 3 VC de buffer A seguido por 3 VC de buffer B. La elución por competencia con imidazol (buffer C) de la proteína inmovilizada, se da entre 3-5 VC. La elución de la proteína de interés es seguida por medición de la absorbancia a 280 nm y por cuantificación por método de Bradford de cada una de las fracciones recolectadas con posterior evaluación mediante geles de poliacrilamida 15%. Previamente se realizó gradiente con 10, 20, 30, 50, 100, 200 y 300 mM de imidazol para determinar las concentraciones de competidor necesarias para eluir el péptido recombinante.

Buffer A: 20mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 10% glicerol y 20 mM imidazol.

Buffer B: Buffer A con 30 mM de imidazol

Buffer C: Buffer A con 300 mM de imidazol

Eliminación del imidazol por diálisis

El “Pool” de eluciones del péptido recombinante obtenidas por cromatografía de afinidad se carga en una membrana de diálisis de 1000 Da (Cole- Parmer) previamente lavada con agua destilada. La diálisis se realiza contra agua destilada (dilución 1/100) durante 2 horas a 4°C bajo agitación magnética. Se cambia tres veces el agua a intervalos de 2 horas. Transcurrida la diálisis se pasa el volumen contenido en la membrana a un tubo falcon y se congela de forma inclinada para su posterior liofilización.

Digestión del péptido recombinante (Trx-EcgDf1) con enteroquinasa

Para determinar la concentración de enteroquinasa necesaria para la digestión total del péptido de fusión (Trx-EcgDf1) se lleva a cabo un ensayo piloto con concentraciones de enteroquinasa (Invitrogen) decrecientes: 4, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 unidades de enzima (UE/ μ l) en 3 μ L de su buffer con 3.4 μ g de péptido fusionado con tiorredoxina más un control sin enteroquinasa, completando con agua destilada hasta un volumen de 30 μ L. Se deja actuar ON a TA y se evalúan los resultados de la digestión en gel de poliacrilamida 15%. Una vez determinada la concentración necesaria de enteroquinasa se calcula para la cantidad de péptido de fusión a digerir. Por último se evalúan los resultados de la digestión en gel de poliacrilamida 15% tris-tricina.

Digestión del péptido recombinante Trx-EcgDf1 con enteroquinasa en columna

Una vez finalizada la elución de todas las proteínas correspondientes al sobrenadante de lisis obtenido de la expresión de EcgDf1 en *E. coli* Rg, se realizaron dos pruebas para la digestión en columna. Se agrega en la columna 0.5 o 1.0 UE/ μ l con su buffer, en 1 VC total (2 ml) y se recupera 1,6 mL del eluato para asegurarse que la enzima entre en la columna. En el caso de 1.0 UE se deja actuar ON y para 0.5 UE 24 horas en batch a TA y luego 24 horas más sin batch. Pasada esta etapa se procede a eluir el percolado y se realizan lavados con un mínimo 3 VC con buffer B hasta que eluyan la enteroquinasa y la tiorredoxina, seguidas por absorbancia a 280 nm. La elución de la proteína por competencia con imidazol (buffer C) se da entre 3-5 VC. Cada una de las fracciones recolectadas es seguida y cuantificada por método de Bradford. Por último se evalúan los resultados de la digestión en gel de poliacrilamida 15% tris-tricina.

6.2.2.2 Electroforesis de proteínas

Para visualizar la producción de proteínas recombinantes y las fracciones obtenidas de las de la cromatografía por afinidad IMAC, se realiza electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida al 15% de 1 mm de espesor. La electroforesis se realiza utilizando el sistema buffer SDS-PAGE propuesto por Laemmli (1970) (tris-glicina) o tris-tricina (Schagger 2006). Las muestras se siembran con ayuda del buffer de carga 2X. Como referencia se siembra un marcador de peso molecular (5 μ L). La corrida se realiza a 75 mV durante 30 min y 100 mV durante 1 hora en buffer de corrida. Una vez finalizada se retiran los geles y se dejan durante 20 min en *shaker* con solución de teñido azul de Coomasie. Se realizan sucesivos lavados con agua destilada y poniendo al microondas por no más de 3 minutos cada lavado hasta decolorar el ruido de fondo.

Buffer de corrida Tris-Glicina(1X): 3,02 g de Tris base, 18,8 g glicina y 5 mL de SDS 20% en 1L de agua destilada.

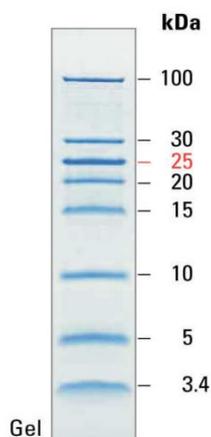
Buffer de corrida Tris-Tricina (1X): 12,08 g de Tris base, 17.92 g tricina y 5 mL de SDS 20% en 1L de agua destilada.

Buffer de carga (2x): 0,1 % azul bromofenol, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 2% Beta-mercapto y 10 % glicerol en agua.

Azul de Coomasie (tinción geles de poliacrilamoda): 0.4 g azul coomasie R25, 20 mL de ácido acético glacial, 100 mL etanol 96% y 80 mL agua destilada.

Marcador de peso molecular ThermoFisher 100 KDa:

PageRuler Low Range Unstained Protein Ladder



6.2.3 Cuantificación proteica por método de Bradford

Previamente, se realizó una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar a 1 mg/mL. Se prepararon concentraciones de dicho estándar de 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ L, en una placa de ELISA. A 20 μ L de cada concentración de BSA estándar se le agrega 180 μ L del reactivo de Bradford. Se deja actuar durante 10 minutos y a la mezcla de reacción se le mide la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Con los valores de absorbancia de las concentraciones del estándar de BSA se realiza la curva de calibración la cual se ajusta a una función lineal de forma $y = ax + b$, siendo y la concentración de BSA en μ L y x la absorbancia a 595 nm, a partir de la cual por interpolación se obtiene la concentración problema de la muestra de interés.

Reactivo de Bradford: 30 mg azul coomasie G250, 15 mL etanol absoluto, 30 mL ácido fosfórico y 255 mL agua destilada.

6.2.4 Determinación de masa de péptidos

Se contrato al servicio de Instituto Pasteur para determinar la masa del péptido EcgDf1-His6 a través de espectrometría de masa MALDI TOF/TOF. Rango m/z 5000-20000. El espectro se obtuvo en un equipo 4800 (Abi Sciex) en el modo de adquisición "Linear Mid". La muestra fue desalada y concentrada por columna en fase reversa en tip (ziptipC4). Se utilizó CHCA 60%ACN/1%TFA como matriz.

6.2.5 Ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*: MIC

Antes de comenzar a evaluar la actividad biológica del péptido Trx-EcgDf1-His6 y EcgDf1 digerido y purificado es necesario preparar los microorganismos contra los cuales se va a probar dicha actividad. En el caso de bacterias se debe contar con un cultivo fresco de *Cmm* y *X. versicatoria* en Agar nutriente mientras que para *S. aureus* en TSA. En el caso de los hongos *A. niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* contar con cultivo de 5 días en placas de petri PDA. Se preparan suspensiones de bacterias 1×10^6 ufc y 1×10^5 de esporas de hongos.

En placa de ELISA del primer carril designado para la evaluación de la actividad del AMP se agrega primero 30 μ L H₂O destilada en todos los pocillos excepto en el primer pocillo para hacer las diluciones seriadas. Luego se agrega 60 μ L de EcgDf1 en el primer pocillo, se mezcla bien antes de sacar 30 μ L y agregarlos al pocillo siguiente, se repite procedimiento hasta llegar al último pocillo donde se mezcla bien y se descarta los 30 μ L. En última instancia se agrega 70 μ L de solución A en cada pocillo con la precaución de resuspender bien con vortex antes de agregar.

En el segundo carril (control de crecimiento) se agregar 30 μ L H₂O destilada en todos los pocillos y 70 μ L de solución A en cada pocillo.

Para el control negativo en el tercer carril solamente se agregar 100 μ l de solución B en todos los pocillos.

El cuarto y último carril correspondiente al antibiótico Gentamicina (0,5 mg/mL) para el caso de bacterias o Propiconazol (0.125 mg/mL) para los hongos se agregan primero 30 μ L H₂O destilada en todos los pocillos excepto en el primer pocillo para hacer las diluciones seriadas. Luego se adiciona 60 μ L antibiótico en el primer pocillo, mezcla bien antes de sacar 30 μ L y agregarlos al pocillo siguiente, repetir procedimiento hasta llegar al último pocillo donde se mezcla bien y se descarta los 30 μ L. Y por último se agregar 70 μ L de solución A en cada pocillo.

Se incuban a tiempo y temperatura correspondiente para cada microorganismo. 24 hs a 37°C para *E. coli* y *S. aureus* ; 48 hs a 28°C para *X. versicatoria* y *Cmm*; para hongos 3 días a 28°C y se mide absorbancia a 595 nm en lector de ELISA, agitando antes de medir.

Solución A: 10 μ L suspensión esporas/bacterias y 60 μ L de medio correspondiente Hongo/bacteria

Solución B: 40 μ L H₂O destilada y 60 μ L medio correspondiente hongo/bacteria

7 Referencias bibliográficas

- Alem D, Díaz-Dellavalle P, Leoni C, De-Simone SG, Correa A, Oppedo P, Dalla Rizza M, 2014. In Search of Topical Agricultural Biofungicides: Properties of the Recombinant Antimicrobial Peptide TrxAq-AMP Obtained from *Amaranthus quitensis*. *Journal Microbial & Biochemical Technology* doi: 10.4172/1948-5948.1000155.
- Benko-Iseppon AM, Galdino SL, Calsa JrT, Kido EA, Tossi A, Belarmino LC, Crovella S, 2010. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein and Peptide Science* 11, 181-188.
- Boman HG, 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61-92.
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue B, Vanderleyden J, 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69, 55-59.
- Brogden KA, Ackermann M, McCray PBJr, Tack BF, 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrobial Agents* 22, 465-478.
- Bruix M, Jimenez MA, Santoro J, Gonzalez C, Colilla FJ, Mendez E, Rico M, 1993. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by ¹H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 2, 715-24.
- Carvalho AO, Gomes VM, 2009. Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30, 1007-1020.
- Colilla FJ, Rocher A, Mendez E, 1990. Gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett*, 270,191–194.
- de Beer A, Vivier MA, 2011. Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes* <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/459>

- De Coninck B, Cammue B, Thevissen K, 2013. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal biology Reviews* 26, 109-120.
- De Paula VS, Razzera G, Medeiro el, Miyamoto CA, Almeida MS, Kurtenbach E, Almeida FCL, Valente AP, 2008. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensina. *Plant Molecular Biology* 68, 321–335.
- El-Mounadi K, Islam KT, Hernández-Ortiz P, Read ND, Shah DM, 2016. Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology* 100, 542-559.
- Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE, 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents Chemother*, 44, 2086–2092.
- Gamba F, Estramil E, 2012. Agresividad diferencial en una población uruguaya de *Cochliobolus sativus* en cebada. *Agrociencia Uruguay* vol.16 no.1
- Ganz, T, 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C.R.Biologies*, 327, 539-549.
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A, 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 105, 179-191.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S, 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2, 1–33.
- Hancock REW, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics, *Trends Biotechnology*. 16, 82–88.
- Hancock REW, Scott, MG, 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 97, 8856–8861.
- Hayden NJ, Maude RB, 1992. The role of seed-borne *Aspergillus niger* in transmission of black mould of onion. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02456.x

- He L, Liu Y, Mustapha A, Lin M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research* 166, 207-215.
- Herbel V, Schafer H, Wink M, 2015. Recombinant production of Snakin-2 (an antimicrobial peptide from tomato) in *E.coli* and analysis of its bioactivity. *Molecules*. 20, 14889-14901.
- Kant P, Liu WZ, Pauls KP, 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*, 9, 1593-1599.
- Klotman ME, Chang TL, 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol* 6, 447-456.
- Koczulla AR, Bals R, 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 63, 389-406.
- Kovaleva V, Krynytskyy H, Gout I & R, 2011. Recombinant expression, affinity purification and functional characterization of Scots pine defensin. *Biotechnologically relevant enzymes and proteins*. 89, 1093–1101.
- Kovalskaya N, Hammond RW, 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 63, 12–17.
- Kragh KM, Nielsen JE, Nielsen KK, Dreboldt S, Mikkelsen JD, 1995. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris* L. *Mo1 Plant-Microbe Interact* 8, 424-434.
- Lacerda AF, Del Sarto RP, Silva MS, de Vasconcelos EA, Coelho RR, Dos Santos VO, Godoy CV, Seixas CD, da Silva MC, Grossi-de-Sa MF. The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*. *3 Biotech*. 2016 Jun;6(1):59. doi: 10.1007/s13205-015-0320.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larrañaga P, Díaz-Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Leoni C, Almeida-Souza AL, Giovanni-De-Simone S, Dalla-Rizza M, 2012 Activity of Naturally Derived Antimicrobial Peptides against Filamentous Fungi Relevant for Agriculture. *Sustainable Agriculture Research*. 1, 2.

- Lay FT, Anderson MA, 2005. Defensins – components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science* 6, 85-101
- Lay FT, Mills GD, Poon IKH, Cowieson NP, Kirby N, Baxter AA, van der Weerden NL, Dogovski C, Perugini MA, Marilyn Anderson A, Kvensakul M, and Mark D. Hulett, 2012. Dimerization of Plant Defensin NaD1 Enhances Its Antifungal Activity. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19961–19972.
- Matsuzaki K, 1999. “Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes”, *Biochimica Biophysica Acta* 1462, 1–10.
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, de Haro C, 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochemistry* 194, 533–539
- Montesinos E, 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters* 1, 1-11
- Padovan L, Crovella S, Tossi A, Segat L, 2010. Techniques for plant defensin production. *Current protein and peptide science* 11, 231-236.
- Padovan L, Scocchil M, Tossil A, 2010. Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein and Peptide Science* 11, 210-2191.
- Payne JA, Bleackley MR, Lee TH, Shafee TM, Poon IK, Hulett MD, Aguilar MI, van derWeerden NL, Anderson MA, 2016. The plant defensin NaD1 introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858, 1099-1109.
- Pelegri PB, Farias LR, Saúde ACM, Costa FT, Bloch-Jr C, Silva LP, Oliveira AS, 2009. Gomes, C.E.M.; Sales, M.P.; Franco, O.L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. *Current Microbiology* 59, 400-404.
- Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA, 2010. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs?. *PLoS Pathog* 10 e1001067. DOI:10.1371/journal.ppat.1001067
- Poon IK, Baxter AA, Lay FT, Mills GD, Adda CG, Payne JA, van der Weerden NL, Anderson MA, Hulett MD 2014. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife* 3, e01808.

- Sagaram US, El-Mounadi K, Buchko GW, Berg HR, Kaur J, Pandurangi RS, Shah DM, 2013. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS One* 8, e82485.
- Schägger H, von Jagow G, 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166. 368-379.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, van Dijck P, 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. *Microbiology and Biotechnology*, 59, 426-435.
- Sels J, Delauré SL, Aerts AM, Proost P, Cammue BP, De Bolle MF, 2007. Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Res.* 4, 531-538.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF, 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochemistry.* 46, 941-50.
- Shai Y, 2002. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Current Pharmaceutical Design* 8, 715–725.
- Silva ON, Mulder KCL, Barbosa EAD, Otero-Gonzalez AJ, Lopez-Abarrategui, C, Rezende TMB, Dias, SC, Franco OL. 2011. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. 2, 232-241.
- Terpe K, 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied. Microbiology Biotechnology* 5, 523-533.
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins
- Thevissen K, de Mello Tavares P, Xu D, Blankenship J, Vandenbosch D, Idkowiak-Baldys J, Govaert G, Bink A, Rozental S, de Groot PW, Cammue BPA, 2012. The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 84,166-180.

- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K, 2002, Plant defensins. 216, 193–202.
- Thomma BPHJ, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP, 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*, 13, 63–68
- Tiozzo E, Rocco G, Tossi A, Romeo D, 1998. Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic, amphipathic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249, 202-206.
- van den Ent F, Loewe J, 2006. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* 67, 67–74.
- van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA, 2013. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 3545-3570.
- van der Weerden NL, Hancock RE, Anderson MA, 2010. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 37513-37520.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135-162.
- van't Hof W, Veerman ECI, Helmerhorst EJ, Amerongen AVN, 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability, *Biological Chemistry* 382, 597–619.
- Vriens K, Cammue B, Thevissen K, 2014. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules* 19, 12280-12303.
- Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE, 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38, 7235–7242.
- Xiong YQ, Yeaman MR, Bayer AS, 1999. In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1111–1117.
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ, 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 181-215.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim, JJ, 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23, 291-296.

Zasloff M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de algún modo me acompañaron durante estos años.

En especial a Gianna por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, por su confianza, aliento, paciencia y todo lo enseñado.

A Susana, por mostrarme estos péptidos maravillosos, enseñarme que no existen “malos resultados” y ayudarme en todo momento.

A todos los del “12” por la buena onda, siempre dispuestos darme una mano. A Agustín por estar siempre para despejar las dudas. A la SUM por el apoyo que nos dieron.

A todos mis amigos de facultad, en especial a Beta y Fede con quien compartí largos momentos de estudio y también diversión. A las “péptidas”, mis amigas de la vida por estar siempre.

A Dami por el apoyo incondicional, por aguantarme durante los periodos de exámenes y entregas.

A mi familia, mi papá y mi abuela y sobretodo a la Lauri que desde el cielo está orgullosa.

Un agradecimiento especial para Uriel Koziol por la corrección exhaustiva.