



**TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
LIC. MILAGROS MAILHOS**

**“ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ENTOMOTÓXICA
JABURETOX Y SU UTILIZACIÓN PARA LA
PRODUCCIÓN DE LEVADURAS CON CAPACIDAD
INSECTICIDA”**

**ORIENTADOR: DR. PABLO AGUILAR
CO-ORIENTADORA: DRA. LAURA HARIPSE**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DE MEMBRANAS
INSTITUT PASTEUR DE MONTEVIDEO**

-2014-

AGRADECIMIENTOS

A Pablo Aguilar y Laura Harispe, por su constante guía y apoyo. Por haber confiado en mí y haberme enseñado tanto académica y humanamente.

A Horacio Silva por su excelente disposición y colaboración en los experimentos de *Piezodorus guildinii*.

A Mónica Moreira (laboratorio de Bioquímica de Vectores de Doenças) por su colaboración en los experimentos de *Aedes aegyptii*.

A Celia Carlini y al grupo de LAPROTOX por su generosa colaboración y ayuda experimental.

A Agustina Olivera, Valentina Salzman, Natalia Carbo, Marcos Nieves y al resto del grupo del Laboratorio de Biología Celular de Membranas por su invaluable apoyo y por hacer mi día a día tan disfrutable.

A la Unidad de Proteínas Recombinantes: Pablo Oppezzo, Cecilia Abreu, Agustín Correa y Claudia Ortega, por entrenarme en el uso de C.E.M, por su excelente disposición y sus constantes sugerencias experimentales.

A la Unidad de Biofísica de Proteínas, especialmente a Gonzalo Obal y Federico Carrión por asistirme en el uso de D.L.S. y por brindar desinteresadamente su tiempo a la hora de asistir mis permanentes consultas.

A todo el grupo del Laboratorio de Genética Molecular Humana, en especial a Paola Lepanto y Victoria Prieto por su permanente apoyo y disposición para discutir resultados.

A Horacio Botti, Felipe Trajtenberg, Sofía Horjales y Bruno Manta por sus valiosos consejos y sugerencias experimentales.

A Mailen Fariello de La Unidad de Bioinformática, por asistirme en el análisis estadístico de los experimentos de *P. guildinii*.

RESUMEN

El desarrollo de nuevas formas de proteger los cultivos contra depredadores y patógenos es actualmente necesario para evitar el uso de productos químicos agresivos al medio ambiente.

La leguminosa *Canavalia ensiformis* posee diferentes isoformas de la enzima ureasa que presentan una potente actividad insecticida. La entomotoxicidad de estas enzimas se basa en la presencia de un péptido interno de 11.1 kDa denominado Jaburetox, que producido de forma recombinante presenta una efectiva actividad insecticida al ser introducido en la dieta de varios insectos de interés médico o agrícola como *Nezara viridula*, *Dysdercus peruvianus* y *Rhodnius prolixus*.

El interés de este trabajo consiste en avanzar en el estudio de alternativas para el control de plagas regionales menos agresivas para el medio ambiente que las actuales empleadas en base a la utilización de la proteína insecticida Jaburetox.

Como primer objetivo nos propusimos construir cepas de levaduras modelo, que mediante la expresión de Jaburetox, sirvieran de base para el desarrollo de nuevos agentes de control biológico. Para ello generamos cepas de *S. cerevisiae* que expresan esta proteína intracelularmente en forma soluble y activa y de manera paralela se construyó un amplio repertorio de condiciones de expresión de Jaburetox en *P. pastoris*. Las cepas construidas en este trabajo podrán ser utilizadas tanto para la producción de esta entomotoxina, así como para el desarrollo de cepas de levaduras con capacidad entomotóxica.

Debido a la relevancia del vector de enfermedades *Aedes aegypti*, nos propusimos determinar si el mismo es sensible a la proteína insecticida Jaburetox y, de ser así, si las cepas de levaduras productoras de Jaburetox tienen capacidad insecticida sobre este insecto y por lo tanto podrían constituir una alternativa atractiva para la producción y entrega de este péptido insecticida a *A. aegypti*. Para esto realizamos ensayos sobre larvas L3 utilizando tanto la proteína purificada como liofilizados de levaduras portadoras de Jaburetox. En resumen, para todos los ensayos realizados, no se observó susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* a la entomotoxina, al menos no en las concentraciones ensayadas.

A su vez, realizamos bioensayos con la plaga de soja *Piezodorus guildinii* buscando determinar si esta especie es sensible a la acción de esta entomotoxina. Nuestros resultados preliminares muestran que dichos insectos son sensibles a la entomotoxina recombinante.

Al momento de iniciado este trabajo sabíamos que durante su purificación y almacenamiento Jaburetox se autoensambla produciendo diferentes estados oligoméricos, pero no teníamos conocimiento sobre cuáles de dichos estados eran activos y responsables de la actividad insecticida. Durante la tercer etapa de este trabajo se abordó el estudio de los distintos grados de oligomerización alcanzados por Jaburetox, buscando determinar aquellos estados responsables de la actividad de la entomotoxina. En conjunto, los resultados obtenidos a través de la caracterización de Jaburetox por Cromatografía de Exclusión Molecular y bioensayos indican que la actividad de esta proteína no está directamente relacionada a un estado oligomérico específico.

De manera paralela se sometió la proteína a distintos tratamientos post-purificación de manera de determinar aquellas condiciones esenciales para la obtención y preservación del estado activo de Jaburetox. Como resultado, hemos puesto a punto un protocolo de purificación y almacenamiento que permite preservar la actividad de Jaburetox por al menos 10 veces más tiempo (10 a 12 semanas) que lo logrado con anterioridad a este trabajo.

ABREVIATURAS

dNTP: desoxirribo-nucleótido trifosfato

g: Fuerza gravitacional

hs: horas

kDa: kilo Daltons

Lts: litros

mA: miliamperes

min: minutos

mg: miligramos

mL: mililitros

mM: milimolar

ng: nanogramos

nm: nanometros

OD: densidad óptica

pb: pares de bases

psi: unidad de presión (del inglés "*pounds per square inch*")

SD: desvío estándar

μ M: micromolar

μ g: microgramos

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	69
6. ANEXOS	71
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Insectos plaga regionales

1.1.1 *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae)

En Uruguay en los últimos años se ha producido un aumento del área de cultivos de verano, especialmente de soja, lo cual genera un desafío para mantener un sistema agrícola sostenible. Uno de los principales grupos de plagas agrícolas son los insectos, afectando de diversa forma y de manera negativa tanto a la producción de campo abierto como a la de invernadero. En el cultivo de soja, la principal limitante es el control de chinches (Hemiptera: Pentatomidae), ya que estos insectos se alimentan principalmente de vainas causando un daño directo e irreversible sobre las semillas (Gomez, Gaona et al. 2013). En Uruguay la especie predominante es *Piezodorus guildinii*. Estos insectos son considerados plaga primaria del cultivo de soja (Ribeiro and Castiglioni 2008), resultando en Uruguay varias veces más dañina que las especies que dominan en las regiones sojeras de Argentina y Brasil (*Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) y *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), respectivamente) (Correa-Ferreira and de Azevedo 2002). A diferencia de otras especies de chinche, *P. guildinii* no cuenta con un complejo de controladores naturales eficientes. Si bien en Uruguay se han encontrado enemigos naturales, como ser el parasitoide de huevos *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae), los mismos no impiden que *P. guildinii*, favorecidos por la abundancia de alimento, alcance umbrales de daño económico año tras año (Ribeiro and Castiglioni 2008).

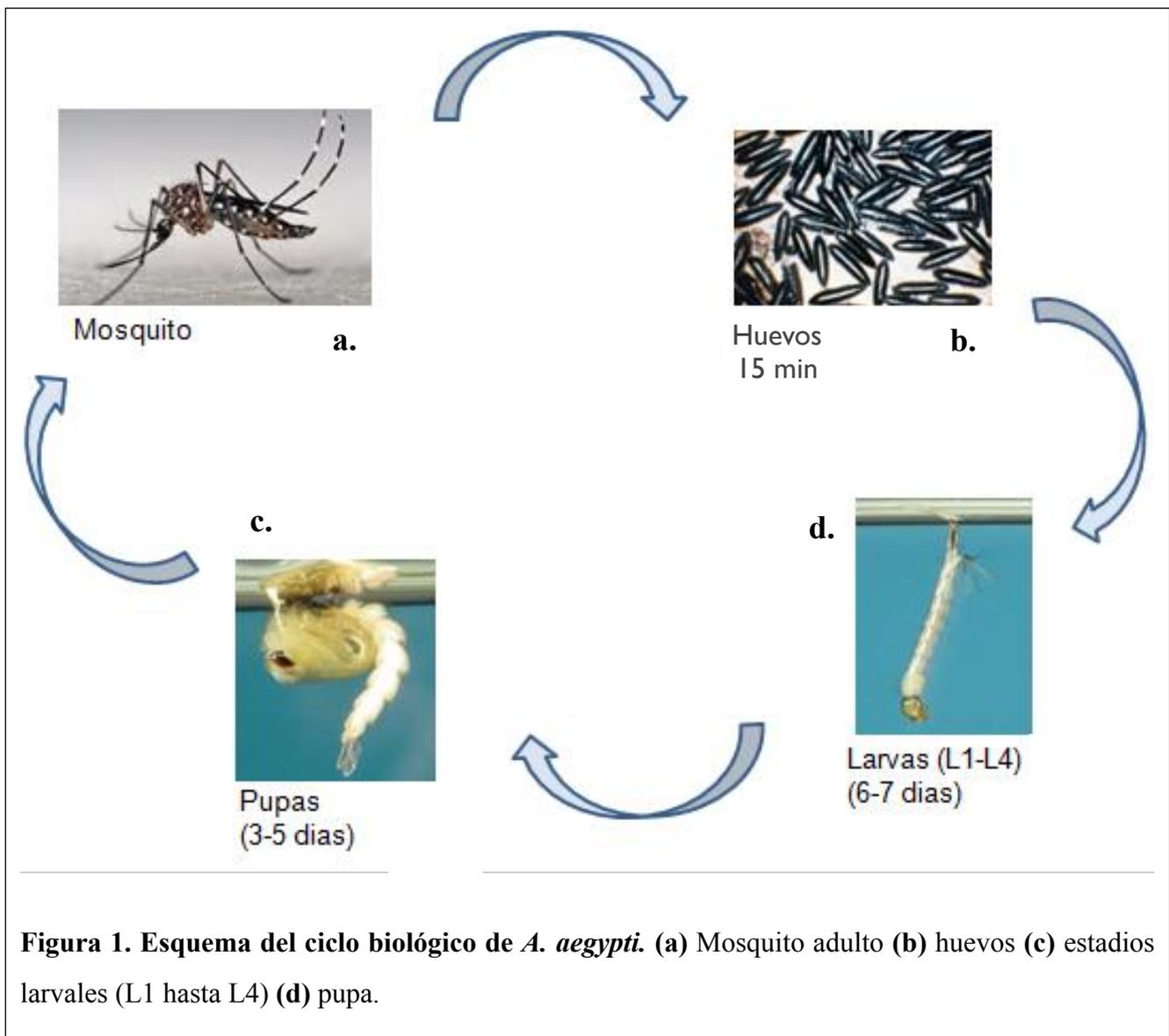
P. guildinii no sólo provoca pérdidas de rendimiento, sino que produce heridas e inocula patógenos (Ribeiro and Castiglioni 2008). Debido a su alta capacidad de daño y a las penalizaciones que se aplican al grano de soja dañado por su baja calidad se suele recurrir a múltiples pulverizaciones de insecticidas por zafra, en general poco selectivos, que tienen un impacto negativo sobre la fauna benéfica y el ambiente (Castiglioni, Ribeiro et al. 2010). Hoy día, para su control se dispone de un escaso número de insecticidas de amplio espectro de acción y baja efectividad, y las múltiples aplicaciones de los mismos no sólo implican un enorme impacto para el medio ambiente, la salud humana y animal, sino que favorecen además el desarrollo de poblaciones de insectos con resistencias a estos productos (Zerbino and Alzugaray 2003, Castiglioni, Ribeiro et al. 2010).

1.1.2 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Otro insecto plaga de gran relevancia en nuestra región es el mosquito *Aedes aegypti*, principal vector de Dengue: enfermedad viral causante de muerte y enfermedad en humanos. En 1947 la Organización Panamericana de la Salud, lanzó un programa continental de erradicación del vector. Para el año 1980 varios países de Sudamérica habían eliminado el mosquito pero la especie quedó latente en varios países del Caribe y Guayanas, constituyendo éstos los focos de reintroducción y recolonización del continente (San Martín, Brathwaite et al. 2010). En el año 1997, luego de 39 años el vector fue encontrado nuevamente en Uruguay (Basso, Romero et al. 2011). Hoy, Uruguay es uno de los pocos países que poseen el vector pero no el virus, siendo este status sanitario el mínimo que debemos mantener.

A. aegypti es un mosquito de hábitos domésticos, que pica durante el día y tiene una preferencia acentuada por la sangre humana (Tauil 2001). El ciclo biológico de *A. aegypti* consta de cuatro estadios: los mosquitos adultos colocan huevos en grupos de a 10 a 30 en paredes de recipientes con agua limpia. Al entrar en contacto con el agua, las larvas eclosionan en un promedio de 15 minutos, y las mismas sufren mudas al ir atravesando los distintos estadios larvales: L1, L2, L3 y L4, a lo largo de aproximadamente una semana. Pasado este tiempo las larvas L4 empupan, fase de duración de aproximadamente 4 días, para luego eclosionar a adultos. Los mosquitos adultos viven cerca de 20 días. En la **figura 1** se representa un esquema del ciclo de vida de este insecto.

Hasta el momento no existe vacuna contra el Dengue, siendo primordial para el control de la enfermedad, el control de dicho vector. El combate del mosquito es complejo y exige acciones coordinadas de varios sectores de la sociedad (Tauil 2001). Para su control, las poblaciones de *A. aegypti* fueron inicialmente combatidas con el insecticida químico DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), pero luego de la aparición y rápida diseminación de resistencia, otros químicos comenzaron a ser utilizados como los organofosforados y piretroides que son más costosos y tienen una actividad más corta, pero contra ellos también hoy se han detectado insectos resistentes (Hemingway and Ranson 2000). Para controlar *A. aegypti*, hoy día los gobiernos invierten grandes sumas de dinero en el combate químico del vector, a pesar de que actúa principalmente sobre el insecto adulto y no sobre las larvas y pueden inducir resistencia.



De ambos ejemplos, se desprende que resulta de alto impacto el desarrollo de nuevos métodos de control diferentes a los actualmente empleados contra ambas plagas, ya que su efecto perjudicial no es sólo a nivel económico sino también social; su control requiere del uso de insecticidas químicos agresivos para el ambiente y la salud humana. Por estas razones, el desarrollo y aplicación de estrategias alternativas para el control de *A. aegypti* y *P. guildinii* resultan prioritarias. En dicho contexto, la generación local de productos biológicos para el control de plagas ofrece una solución alternativa y complementaria al uso tradicional de plaguicidas químicos.

1.2 Problemas asociados al uso de insecticidas químicos y alternativas actuales

Según los datos de la agencia de protección del medio ambiente (EPA, USA) en el año 2005 el mercado mundial de insecticidas fue de 12,465 millones de dólares (Aspelin 1997). De este total alrededor del 85% se utilizó en la agricultura. El uso de insecticidas químicos es la estrategia que se utiliza con más frecuencia para el control de insectos plagas, aunque represente un peligro para los humanos y el ambiente. El uso continuo de los mismos ha causado un daño severo en el ambiente, en la salud humana y reducido la sustentabilidad de la agricultura. La fauna y flora se han visto gravemente afectadas, causando reducción de predadores benéficos para los ecosistemas productivos y ocasionando el aumento y rápida proliferación de numerosas plagas (Wilson and Tisdell 2001). Sumado a esto, la resistencia provocada por el manejo excesivo de agroquímicos conlleva a la necesidad de utilizar productos cada vez más potentes (Rodríguez, Bisset et al. 1999, Brengues, Hawkes et al. 2003), o aumentar el número de aplicaciones. A pesar de todos estos impactos negativos y los costos que acarrea, el uso de insecticidas químicos sigue aumentando en el mundo (Wilson and Tisdell 2001).

Como alternativas al uso de insecticidas químicos, en las últimas décadas varias estrategias se han estudiado y aplicado, entre las más exitosas se destaca el uso de Agentes de Control Biológico (ACBs) y más recientemente el uso de ACBs genéticamente modificados, a los cuales se les confiere ventajas o herramientas que potencian su efectividad contra las plagas.

1.2.1 Agentes de control biológico (ACBs)

Una de las estrategias de uso más frecuente contempla la utilización de enemigos naturales de las plagas. En sentido amplio, Control Biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro (Templeton and Smith 1977). En el caso del uso de ACBs para controlar insectos, estos procedimientos consisten en introducir en el seno de las poblaciones de los mismos, factores naturales de regulación como predadores, parásitos, microorganismos patógenos, ente otros. Las investigaciones en esta área no son nuevas, pero exigen un buen conocimiento de la ecología de los insectos por controlar y del ecosistema circundante (Zuñiga, Peraza et al. 2009).

El ejemplo más exitoso de ACB para el control de insectos plagas es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). El insecticida bacteriano Bt, con sus diferentes toxinas y esporas, se convirtió en una alternativa muy efectiva, ya que es específica para controlar dípteros, lepidópteros, himenópteros y algunos coleópteros con muy bajo impacto ambiental y con el beneficio de que no

resulta tóxico para otros organismos como ser mamíferos o pájaros (Gatehouse, Ferry et al. 2002). También es de gran utilidad frente a la aparición de resistencia a los plaguicidas químicos (Masuh, Seccacini et al. 2002). En la actualidad existen más de cien productos en el mercado que incluyen, en su formulación, distintas subespecies silvestres de Bt (Sanahuja, Banakar et al. 2011).

Las diferentes subespecies de Bt producen variantes diferentes de endotoxinas. Entre las más abundantes se encuentran las proteínas pertenecientes a las familias Cry y Cyt (Bravo, Gill et al. 2007). Estas toxinas son inactivas en su forma nativa, y antes de que la toxicidad pueda ocurrir las mismas deben ser procesadas proteolíticamente. La proteólisis requiere del pH presente en el estómago medio de los insectos e implica el clivado de ambos extremos proteicos (Whalon and Wingerd 2003). Una vez activadas las toxinas reconocen y se unen a receptores específicos de las células que conforman la membrana epitelial del estómago medio. Las proteínas unidas a sus receptores se insertan en la membrana celular e interactúan entre sí formando poros de membrana provocando la lisis osmótica de las células. El daño provocado por estas toxinas desencadenan en la muerte del insecto ya sea por inanición o septicemia (Whalon and Wingerd 2003).

Un ejemplo del uso de Bt lo constituye la subespecie *israeliensis* (Bti). Aislada en 1975, se probó efectiva contra larvas de dípteros (Goldberg and Margalit 1977), con lo cual se comenzó a estudiar su aplicación como controlador de la expansión del vector de la malaria *A. aegypti* ((Margalith and Ben-Dov 2000, Fillinger, Knols et al. 2003). Esta subespecie expresa cuatro proteínas Cry diferentes (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa) y dos proteínas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba) (Berry, O'Neil et al. 2002). Las proteínas Cyt interactúan directamente con la membrana epitelial del estómago medio de las larvas y actúan a su vez como receptores de las toxinas Cry potenciando de manera sinérgica el efecto tóxico (Sanahuja, Banakar et al. 2011). Actualmente la unión Europea tomó la decisión de aceptar Bti como el único producto aprobado para el control de los mosquitos y seguramente otros países no europeos sigan este ejemplo (Paris, David et al. 2011).

De manera similar, el uso de ACBs también es ampliamente utilizado para el control de fitopatologías. Este campo de investigación es relativamente nuevo en comparación con el anterior, pero aún así ya existen hoy un total de catorce bacterias y doce hongos registrados para el control de diversas enfermedades de cultivos (Fravel 2005). La mayoría de ellos ya se utilizan de manera comercial (Junaid, Dar et al. 2013).

1.2.2 ACBs genéticamente modificados

El desarrollo de herramientas biológicas alternativas frente a los insecticidas químicos es un área de investigación en el mundo, donde existe una demanda creciente de compuestos cada vez más seguros. Los avances en la tecnología de ADN recombinante dispararon el potencial de mejorar los ACBs utilizándoles ventajas o herramientas que potencian su efectividad contra las plagas. Bacterias, virus y hongos han sido los organismos de preferencia, en términos de potenciar su acción insecticida, ya que estos organismos son fácilmente manipulables por técnicas de genética molecular (Bonning and Hammock 1992).

Continuando con el ejemplo del biopesticida Bt, a pesar de los beneficios que presenta esta herramienta biológica, los productos inicialmente registrados no competían bien contra el uso de químicos debido a su menor performance en el control de insectos. Esto disparó una búsqueda de estrategias para mejorar su eficacia mejorando la toxicidad intrínseca de las bacterias disponibles; sea aumentando el nivel de expresión de las proteínas Cry/Cyt o combinando en una sola cepa toxinas provenientes de subespecies distintas de manera de aumentar el rango de acción de la misma (Sanahuja, Banakar et al. 2011). Hoy ya existen en el mercado productos que incluyen en sus formulaciones cepas recombinantes de Bt (Sanahuja, Banakar et al. 2011).

Una derivación del uso de Bt, de enorme impacto en el mundo, es la generación de plantas transgénicas que expresan las proteínas Cry y Cyt en sus tejidos. En 1995 la EPA aprobó el registro de maíz, papa y algodón Bt y ya para 1998 varios cultivos Bt eran utilizados en el mundo (Sanahuja, Banakar et al. 2011). Debido al éxito de esta tecnología, hoy día son más de 25 los países que utilizan estos cultivos de manera regular y como consecuencia el uso de insecticidas químicos ha disminuido dramáticamente en las áreas donde estos se utilizan (Bravo, Gill et al. 2007).

La posibilidad de patentar y utilizar organismos genéticamente modificados ha servido de incentivo para la industria creando un nuevo campo de investigación que explora alternativas mejoradas de ACBs (Bonning and Hammock 1992). El tremendo impacto de esta nueva tecnología ha impulsado una búsqueda de compuestos posibles a ser utilizados como potenciadores de la toxicidad de los ACBs, entre los que se destacan enzimas hidrolíticas, proteínas antifúngicas o proteínas naturales de plantas con efectos tóxicos en insectos, entre otras (Herrera-Estrella and Chet 1999, Carlini and Grossi-de-Sa 2002, Jones and Prusky 2002).

1.3 Uso de levaduras como ACBs

Dentro de la gran diversidad de ACBs, las levaduras han recibido mucha atención recientemente y han aparecido en la literatura numerosos ejemplos de su aplicación como controladores biológicos de diversos patógenos en cultivos variados como vid, tomates, manzanas, cítricos, entre otros (Chand-Goyal and Spotts 1997, Droby, Deus et al. 1998, El-Ghaouth, Smilanick et al. 2000, Punja and Utkhede 2003, Masoud, Cesar et al. 2004).

Las levaduras son convenientes como ACBs por diversas razones: i) tienden a colonizar rápidamente y sobrevivir bajo diferentes condiciones, ii) utilizan los nutrientes disponibles de manera eficiente limitando la disponibilidad de los mismos a patógenos, iii) generalmente no son afectados por los fungicidas de uso comercial, iv) varias especies de levaduras son organismos considerados seguros o GRAS (del inglés Generally Recognized As Safe) y v) su genética y biología molecular es ampliamente conocida (Jones and Prusky 2002).

Las técnicas de transformación genética en levaduras han abierto una oportunidad para el mejoramiento de la capacidad plaguicida de estos agentes, y se han desarrollado estrategias exitosas que permiten el control poblacional de las mismas en la naturaleza, permitiendo de esta manera establecer mecanismos de control en su uso como ACBs (Akada, Matsuo et al. 1999, Jones and Prusky 2002, Cebollero, Martinez-Rodriguez et al. 2005, Ramirez and Ambrona 2008).

En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos donde se estudia la eficiencia de diferentes especies de levaduras transformadas para expresar proteínas tóxicas sobre organismos plagas. La mayoría de ellos estudian la aplicabilidad de dichas levaduras recombinantes sobre hongos productores de enfermedades post-cosecha (Jones and Prusky 2002, Janisiewicz, Bastos Pereira et al. 2008, Ren, Kong et al. 2012)

1.4 Jaburetox, toxina insecticida natural de plantas

Muchas clases de proteínas derivadas de plantas tienen efectos tóxicos sobre insectos. Un ejemplo de esto son las ureasas, que presentan un efecto entomotóxico independiente de su actividad catalítica (Follmer, Barcellos et al. 2001). La principal función de las ureasas en plantas está relacionado con el reciclaje de nitrógeno, ya que estas enzimas catalizan la hidrólisis de urea a amonio y dióxido de carbono (Dixon, Gazzola et al. 1975), pero diversas actividades biológicas

independientes de la actividad ureolítica han sido demostradas (Follmer, Barcellos et al. 2001) sugiriendo que esta podría estar relacionada con la protección de las plantas al ataque de patógenos.

En las semillas de la leguminosa *Canavalia ensiformis* (Fabales: Fabaceae) se encontró una isoforma de la enzima ureasa, llamada Canatoxina (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007), que resulta tóxica para insectos con sistemas digestivos ácidos pero que no afecta a aquellos con sistemas digestivos alcalinos (Carlini, Oliveira et al. 1997). Dentro de los insectos sensibles a esta toxina se encuentran varios de interés médico y agronómico como *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) y *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). La capacidad entomotóxica de la Canatoxina depende de un polipéptido interno de 11.1 kDa, que puede ser producido *in vitro* al hidrolizar la proteína con catepsinas obtenidas de insectos sensibles (Ferreira-DaSilva, Gombarovits et al. 2000). Estos resultados explicarían entonces la resistencia a Canatoxina por parte de insectos con sistemas digestivos a base de tripsinas: esta proteasa no digiere a Canatoxina de manera tal que libera al polipéptido interno de 11.1 kDa responsable de la acción entomotóxica. Un polipéptido llamado Jaburetox, equivalente al producido por digestión con catepsina, fue producido de manera recombinante en *Escherichia coli*, y presentó actividad insecticida al ser introducido en la dieta de varios insectos, incluyendo insectos que no eran sensibles a la ureasa intacta (Mulinari, Freitas-Silva et al. 2004, Tomazetto, Mulinari et al. 2007, Staniscuaski, Te Brugge et al. 2009). En contraste con su efecto entomotóxico, se ha demostrado que la administración oral o mediante inyección intraperitoneal de altas dosis de Jaburetox (10 mg/kg) a ratones y ratas, no produce la muerte ni síntomas de toxicidad aguda (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007). Así, esta entomotoxina parece resultar inocua en mamíferos y por lo tanto reviste de gran interés ahondar en el mecanismos por el cual este polipéptido tiene función insecticida.

Actualmente existen limitantes al trabajo con Jaburetox ya que la misma es una proteína sumamente inestable, poco caracterizada y cuyo estado activo y mecanismo de acción molecular no se conocen en profundidad. Empero, resultados indican que Jaburetox es efectiva contra insectos plagas de interés regional tales como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *D. peruvianus* y *N. viridula* (Pires-Alves, Grossi-de-Sa et al. 2003), posicionándola como candidata para el desarrollo de insecticidas biológicos.

2. OBJETIVOS

El interés de este trabajo es avanzar en el estudio de alternativas para el control de plagas regionales menos agresivas para el medio ambiente que las actuales empleadas.

Específicamente este proyecto se propone generar nuevas alternativas para el control de *P. guildinii* y *A. aegypti* utilizando la proteína insecticida Jaburetox purificada y en paralelo desarrollando cepas de levaduras que, mediante la expresión de la entomotoxina, puedan servir como base para el desarrollo de nuevos ACBs que cumplan con criterios internacionales de trazabilidad genética, impacto ambiental y bioseguridad animal y humana.

Para alcanzar este fin, como objetivos específicos este proyecto plantea:

1. La construcción de cepas de levaduras modelo (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) productoras de Jaburetox.
2. El estudio de la acción de Jaburetox y de las levaduras productoras de Jaburetox sobre *P. guildinii* y *A. aegypti*.
3. La caracterización bioquímica del estado activo de Jaburetox durante las distintas etapas post-purificación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Construcción de cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* productoras de Jaburetox.

3.1.1 Cepa, vectores y oligonucleótidos utilizados para expresión en *S. cerevisiae*

Tabla I- Cepa utilizada

Cepa	Genotipo	Origen
W303	Silvestre, <i>MATa</i> , <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	LBCM

Tabla II- Vectores utilizados

Plásmido	Descripción	Origen
pTL58	Vector para expresión de proteína heterólogas en <i>S. cerevisiae</i> bajo control del promotor inducible por galactosa del gen <i>GAL1</i> (<i>pGAL1</i>). El vector contiene el origen de replicación <i>ARS</i> que si bien es de alto número de copias, contiene además la secuencia centromérica <i>CEN</i> que garantiza una segregación mitótica estable del plásmido pero disminuye el número de copias por célula a 1 o 2. Para selección de transformantes en levaduras contiene el gen <i>LEU2</i> y el gen de resistencia a ampicilina para selección en <i>E. coli</i> .	Laboratorio de Tobías C. Walther
pYES2	Vector para expresión de proteínas heterólogas en <i>S. cerevisiae</i> bajo control del promotor <i>pGAL1</i> . El vector contiene el origen de replicación de 2 micrones (2 μ) que confiere un alto número de copias por célula, el gen <i>URA3</i> para selección de transformantes de levaduras y el gen de resistencia a ampicilina para selección en <i>E. coli</i> .	Invitrogen

Tabla III- Oligonucleótidos utilizados

Nº	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
1	274	CGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCT CGGTATCAGTGGTGGTGGTGGTGG TGCTCG	Oligo anti-sentido para la amplificación de Jaburetox-V5 y posterior clonado en el plásmido PYES
2	276	ACGACTCACTATAGGGAATATTAAG CTTGGATGGGTCCAGTTAATGAAGC CAATTG	Oligo sentido para la amplificación de Jaburetox-V5 y Jaburetox-2Ec posterior clonado en el plásmido PYES
3	275	CGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCT CGGTATCAATGGTGGTGGTGGTGGT GACCG	Oligo anti-sentido para la amplificación de Jaburetox-2Ec y posterior clonado en el plásmido PYES

3.1.2 Secuencias de Jaburetox y vectores utilizadas

El clonado de las secuencias en el vector replicativo pYES2 bajo el control del promotor del gen Gal1 inducible por galactosa fue realizado por Laura Harispe (Institut Pasteur de Montevideo). El clonado de todos los vectores se realizó *in vivo* por “Gap Repair” (Muhlrad, Hunter et al. 1992) para el cual primero se amplificaron los genes de Jaburetox-2Ec y -V5 utilizando oligos N° 1 a 3 (ver **tabla III**) con sitios de homología a los extremos de la región polylinker del vector PYES2 y finalmente se transformaron cepas haploides silvestres de *S. cerevisiae* W303 con el gen amplificado junto con el vector PYES2 linealizado con *DpnI*.

A su vez, posteriormente se obtuvieron secuencias Jaburetox-2Ec y Jaburetox-V5 recodificados para la óptima expresión en levaduras sintetizadas por GeneScript (USA Inc). GeneScript utiliza un algoritmo que considera distintos factores que regulan e influyen en la correcta expresión de los genes produciendo sintéticamente un único gen optimizado para alcanzar el nivel máximo de expresión. Entre las características consideradas se incluye; la frecuencia de uso de codones de la especie, contenido GC, estructuras secundarias presentes en el ARNm que pueden interferir en la estabilidad ribosomal, entre otros. Las secuencias recodificadas (que llamamos “optimizadas”) fueron sintetizadas de manera tal que incluyeran en sus extremos las mismas zonas de homología correspondientes a los extremos de la región polylinker del vector PYES2, flanqueadas por sitios de restricción para la enzima *EcoRI*. Se digirieron los plásmidos utilizando esta enzima y se transformaron levaduras con los fragmentos obtenidos juntos con en el vector PYES2 linealizado de igual manera que las anteriores (Muhlrad, Hunter et al. 1992).

3.1.3 Transformación de *S. cerevisiae*

Para la transformación de los vectores PYES2 conteniendo ambas secuencias optimizadas en las cepas haploides W303, se utilizó el método de sales de litio (Gietz and Schiestl 2007). Brevemente, se partió de un cultivo fresco en YPD (10g/l de extracto de levadura, 20g/l de peptona y 20g/l de dextrosa) en fase logarítmica (D_{600nm} entre 0.4 y 0.5), se recogieron las células por centrifugación (3 min a 800g) y se resuspendieron cuidadosamente en 1 mL de LiTE 1x (Acetato de Litio) 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM). Se repitió la centrifugación y se resuspendieron las células en LiTE 1x (100 μ l por tubo de transformación). Luego se agregó esperma de salmón, previamente hervido a 100 °C durante 5 min y se incubó sin agitación 30 min a 30 °C junto con el ADN a transformar (volumen \leq 10 μ l) y 750 μ l de PEG LiTE (LiTE 1x y 40 % PEG₂₀₀₀). Pasado este tiempo se agregó 100 μ l de DMSO y se llevo a 42 °C durante 10 min. Luego se centrifugaron las

células (2 min a 800 g), se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de YPD y se dejaron recuperar durante 1 h a temperatura ambiente para luego sembrar en placas SC-URA-Agar (medio sintético que contiene 0.6 g/l de YNB con agregado de 14 aminoácidos y 15 g/l de Agar).

3.1.4 Inducción de la expresión de Jaburetox en S. cerevisiae

Para realizar la inducción de la expresión de todas las secuencias clonadas de Jaburetox, se partió de un precultivo de levaduras crecidas toda la noche a 30 °C y 220 rpm en medio SC-URA con 0,1% glucosa. Se midió la D.O_{600nm} del precultivo y se centrifugó el volumen necesario para inocular el medio de inducción SC-URA con 2% galactosa para alcanzar una D.O_{600nm} de 0,4.

3.1.5 Extracción de proteína de S. cerevisiae para análisis por Western blot

Aproximadamente 10 DO₆₀₀ celulares fueron resuspendidos en un tubo de 1.5 mL con 200 µl de Urea 8M, HEPES 50 mM. A cada tubo se le agregaron aproximadamente 200µl de perlas de zirconia de 0.7 mm de diámetro (BioSpec Products, 1109107zx) y se agitaron en beadbeater (Genius) por 5 minutos a 4 °C. Luego se le agregó 10 µl SDS 10% a cada tubo y se incubaron a 65 °C por 5 minutos. Luego se centrifugaron a máxima velocidad por 10 minutos y el sobrenadante fue recolectado y las proteínas fueron cuantificadas mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA, Sigma) y almacenadas a -20 °C diluido en cantidades necesarias de buffer de muestra 2x para SDS-PAGE (Tris 25mM pH 6.8, SDS 5%, Glicerol 4%, β-Mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,02%).

3.1.6 Ensayos de Western blot

En todos los casos las proteínas fueron analizadas en geles de poliacrilamida 15% y transferidas a membranas de polifloruro de vinilideno (PVDF, GE Healthcare) en sistema húmedo por 105 min a 330 mA con refrigeración a 4°C. Las membranas se bloquearon en Solución de Bloqueo (SB, leche descremada 5% disuelto en buffer Tris 50 mM pH 7.6, glicina 0.1 M y Tween-20 0,1 %) toda la noche a 4 °C. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios (este último conjugado a la peroxidasa HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*) se realizó en SB por 2 hs a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron en SB sin leche descremada. La inmunodetección se realizó usando el kit comercial ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) y membranas Hyperfilm ECL para Quimioluminiscencia (GE Healthcare). La sobreexposición de las placas fue prevenida variando los tiempos de exposición para evitar obtener señales saturadas. Como control

de carga se utilizó un marcador de peso pre-teñido de rango entre 10 y 250 kDa (Thermo Scientific, 26619).

Como anticuerpo primario se utilizó un suero de conejo polyclonal anti-Jaburetox recombinante proporcionado por Celia Carlini (Laprottox, UFRGS) diluido 1/7500 y para realizar el control de carga se utilizó anticuerpo polyclonal de suero de conejo anti-Pil1 (Moreira, Walther et al. 2009) diluido 1:20000 o el anticuerpo de conejo anti-Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH, Sigma, A9521) diluido 1:300000. Como anticuerpo secundario se utilizó en todos los casos anti-Conejo IgG-HRP diluido 1/16000 (Sigma, A0545).

3.1.7 Estudio de viabilidad de cepas de S. cerevisiae productoras de Jaburetox

Para estudiar si la expresión de la entomotoxina afectaba la viabilidad celular de la cepa utilizada se evaluó el crecimiento celular por turbidimetría a 600 nm. Para esto se realizaron inducciones por triplicado (ver 3.1.3) de las cepas utilizadas para la expresión de Jaburetox y como control se utilizó una cepa transformada con el vector PYES2 vacío tomándose muestras de cultivo a las 0, 4, 8, 10, 12 y 14 horas del inicio de la inducción y midiéndose la Abs_{600 nm}.

3.1.8 Fraccionamiento sub-celular.

Se centrifugaron 30 OD₆₀₀ de levaduras inducidas 5 minutos a 4000 g. Luego se resuspendieron en 300 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH=7,4, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM), se les agregó el equivalente en volumen a 200 µl de perlas de zirconia de 0.7 mm de diámetro (BioSpec Products, 1109107zx) y se lisaron con cuatro pulsos de 2 minutos a 4 °C. Al final se le agregaron 300 µl más de buffer de lisis y se centrifugaron las muestras 4 minutos a 300 g para eliminar las perlas de zirconia juntos con restos de células enteras y núcleos. Se transvasó el sobrenadante y se sometió a una segunda centrifugación de 15 minutos a 17000 g. El sobrenadante (fracción citoplasmática soluble) fue diluido 1:1 en buffer de muestra para SDS-PAGE y almacenado a -20 °C. El pellet (fracción citoplasmática insoluble) fue resuspendido en 600 µl de buffer de lisis y almacenado en iguales condiciones que el sobrenadante. Se detectó la presencia de la proteína en las diferentes fracciones obtenidas por ensayo de Western blot. Se detectó a su vez la presencia de G6PDH como control de la fracción soluble. El control del Western blot fue realizado con levaduras transformadas con el vector vacío.

3.1.9 Cuantificación de Jaburetox mediante Western blot.

Se cargaron en SDS-PAGE 15 % cantidades conocidas de Jaburetox purificada de *E. coli* (42, 30, 21, 10 y 3 ng) y 1 y 2 µg de proteína total de extractos de levaduras a cuantificar. En todos los casos, las cuantificaciones fueron realizadas a partir de placas radiográficas de exposiciones no saturadas. Las mismas fueron escaneadas y analizadas utilizando la herramienta de análisis de geles del software Image J. Primero se determinó el rango de linealidad de la señal obtenida para las concentraciones de proteína conocidas y se utilizaron estos datos para construir la curva de calibración de señal emitida por estas muestras en función de la cantidad de proteína cargada (ng). Para conocer la cantidad de Jaburetox de las muestras de levaduras, se interpolaron en la curva de calibración los datos de señal emitida por estas muestras y se calcularon así la concentración de proteínas en el volumen de muestra utilizado. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.1.10 Cuantificación de Jaburetox por unidad de biomasa

Se hicieron tres inducciones independientes de 25 mL de cultivo. Pasado el tiempo de inducción (8 hs) se tomaron 3 mL de la muestra para realizar la extracción y cuantificación de proteína total (µg/ml) y cuantificación de Jaburetox por Western blot (ver 3.1.4, 3.1.5 y 3.1.6 de esta sección) y el resto del cultivo fue centrifugado 5 minutos a 3000 g, liofilizado (Labconco Freezone, 7753030) y pesado (mg). Mediante Western blot se cuantificaron los ng de Jaburetox por µg de proteína total y con los datos de proteína total extraídos se calculó el total de Jaburetox en los 3 mL de medio utilizados. Luego extrapolando dichos datos se determinó el total de Jaburetox presentes en los restantes 22 mL de medio y se dividieron según los mg de liofilizado obtenidos de manera de calcular los µg de proteína por mg de liofilizado.

3.1.11 Purificación de proteínas de S. cerevisiae

Se indujeron 2 lts de cultivo celular durante 8 hs y las células fueron luego centrifugadas, lavadas en agua destilada y su pellet pesado. Posteriormente se resuspendieron en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM y PMSF 1 mM) utilizando 3 mL de buffer por gramo de pellet. Previo a realizar la homogenización, las células se sonicaron con 4 pulsos a 20 mA. La homogenización se realizó en equipo Avestin High Pressure Homogenizer C5 realizando cuatro pasos a 25000 psi. Se verificó la correcta lisis de las células por observación en microscopio de campo claro utilizando como control células sin tratar.

El homogeneizado se centrifugó a 4000 g por 20 minutos y el sobrenadante fue cargado en columnas HisTrap de GE (1 ml) previamente equilibradas en buffer de lisis. Las columnas fueron lavadas con el mismo buffer conteniendo 50 mM de imidazol y la proteína fue eluída con 200 mM de imidazol, cuantificada por Bradford (B6916, Sigma) y por último dializada durante dos días en 20 mM de buffer fosfato pH 7,5 con 1mM de EDTA y 5 mM β -mercaptoetanol y luego se sometió a una tercer diálisis en 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7 (protocolo idéntico al utilizado para la proteína purificada de *E. coli*). Se analizaron muestras del homogeneizado total obtenido, la fracción no retenida luego del primer pasaje por la columna y el eluido de las columnas por coomasie y Western blot.

3.1.12 Bioensayos de actividad funguistática

La actividad funguistática de la proteína purificada fue evaluada sobre cepas de *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, tal cual estaba ya descrito para la proteína producida en *E. coli* (Postal, Martinelli et al. 2012). Para ello, células de *S. cerevisiae* (1038) y *K. marxianus* (CE025), fueron crecidas en placas de Petri con medio Sabouraud agar (peptona 1%, glucosa 2% y agar 2%) por 24 h a 30 °C. Para los ensayos, se suspendieron las células en medio Sabouraud líquido y se llevaron a una concentración celular de 1×10^4 por ml. Se colocaron 60 μ l de dilución celular en placas de 96 wells con fondo en U incubadas junto con concentraciones a ensayar de la proteína. Pasadas las 48 hs de incubación a 30 °C sin agitación, el crecimiento celular fue evaluado por turbidimetría a una longitud de onda de 620 nm. Todos los experimentos fueron realizados por triplicados. Los datos fueron evaluados utilizando “one-way” ANOVA seguidos del test múltiple de Tukey. En todos los casos un p-valor < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron utilizando los programas GraphPad Prism.

3.2 Construcción de cepas haploides de *Pichia pastoris* productoras de Jaburetox.

3.2.1 Cepa, vectores y oligonucleótidos utilizados para expresión en *P. pastoris*

Tabla IV- Cepa utilizada

Cepa	Genotipo	Origen
X-33	Silvestre, Mut ⁺ , His ⁺	Invitrogen

Tabla V- Vectores utilizados

Plásmido	Descripción	Origen
pPICZ A	Plásmido para expresión intracelular de proteína bajo control del promotor inducible por metanol; AOX1. Contiene el gen <i>Sh ble</i> que confiere resistencia al antibiótico zeocina para selección de transformantes de <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i> .	Invitrogen
pPICZ α A	Plásmido para expresión extracelular de proteína (contiene la señal de secreción del factor α de <i>S. cerevisiae</i>) bajo el promotor inducible por metanol: AOX1. Contiene el gen <i>Sh ble</i> que confiere resistencia al antibiótico zeocina para selección de transformantes.	Invitrogen
pGAPZ A	Plásmido para expresión intracelular de proteína, bajo control del promotor constitutivo de la proteína Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa: GAP. Contiene el gen <i>Sh ble</i> que confiere resistencia al antibiótico zeocina para selección de transformantes.	Invitrogen
pGAPZ α A	Plásmido para expresión extracelular de proteína (contiene la señal de secreción del factor α de <i>S. cerevisiae</i>) bajo control del promotor constitutivo de la proteína Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa: GAP. Contiene el gen <i>Sh ble</i> que confiere resistencia al antibiótico zeocina para selección de transformantes.	Invitrogen

Los vectores fueron cedidos por Monica Marín (Sección de Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR). El mapa y las características de los vectores se muestran en el ANEXO II.

Tabla VI- Oligonucleótidos utilizados

Nº	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
4	RFPp.301-F	CGAAACGAGGAATTCACGTGGCCAG CCATGGGTCCAGTTAATGAAGCCAATT G	Amplificación de Jbx-2Ec y -V5 y clonado en pPICZ A, pGAPZ A.
5	RFPp.302-R	GGAACAGTCATGTCTAAGGCTAAAAC CATCAATGGTGATGGTGATGATGACCG GTACG	Amplificación de Jbx-2Ec y clonado en pPICZ A, pGAPZ A.
6	RFPp.303-R	GGCTAAAAC TCAATGATGATGATGATG ATGCTCGAGTATAACTTTTCCACCTCC	Amplificación de Jbx-V5 y clonado en pPICZ A, pGAPZ A.
7	RFPp.304-F	GAATTCACGTGGCCAGCCGGCCGTCT CGGATGGGTCCAGTTAATGAAGCCAAT TG	Amplificación de Jbx-2Ec y -V5 y clonado en pPICZ α A, pGAPZ α A.
8	RFPp.305-R	GGAACAGTCATGTCTAAGGCTACAAAC TCATCAATGGTGATGGTGATGATGACCG GTACG	Amplificación de Jbx-2Ec y clonado pGAPZ α A.
9	RFPp.306-R	GCTACAAAAC TCAATGATGATGATGATGA TGCTCGAGTATAACTTTTCCACCTCC	Amplificación de Jbx -V5 y clonado en pPICZ α A
10	RFPp.309-R	CTGAGGAACAGTCATGTCTAAGGCTAA AACTCAATGATGATGATGATGATGACCT G	Amplificación Jbx-2Ec optimizada y clonado en pPICZ A y pGAPZ A
11	RFPp.310-F	CGAAACGAGGAATTCACGTGGCCAG CCATGGGACCTGTTAATGAAGCCAAC T	Amplificación Jbx-2Ec optimizada y clonado en pPICZ A y pGAPZ A
12	RFPp.311-R	CTGAGGAACAGTCATGTCTAAGGCTAA AACTCAATGATGATGATGATGATGACCT G	Amplificación Jbx-2Ec optimizada y clonado en pGAP α A
13	RFPp.312-R	GAGGAACAGTCATGTCTAAGGCTACAA ACTCAATGATGATGATGATGATGACCTG	Amplificación Jbx-2Ec optimizada y clonado en pPIC α A
14	RFPp.313-F	TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGC TGAAATGGGACCTGTTAATGAAGCCAA CTG	Amplificación Jbx-2Ec optimizada y clonado en pPIC α A y pGAP α A

3.2.2. Medios de cultivo

Tabla VII- Medios de cultivo

Medio	Descripción	Aplicación
YPD	Medio complejo rico	Crecimiento general y almacenamiento de cepas
YPDS + Zeocina	YPD con sorbitol y Zeocina	Selección de transformantes resistentes a Zeocina
MGY	Medio mínimo con glicerol	Generación de biomasa previo a la inducción con metanol
MM	Medio mínimo con 0,5% de metanol	Inducción de la expresión

3.2.3. Clonado en vectores de expresión para *Pichia pastoris*.

Para el clonado de las versiones de los genes Jaburetox-V5 y Jaburetox-2Ec optimizadas y sin optimizar en los vectores escogidos se escogió la técnica *Restriction-Free* (RF) *cloning* (Unger, Jacobovitch et al. 2010). Para esto se diseñaron oligonucleótidos (Nº 4 al 14, ver **Tabla VI**). Estos

oligos son específicos de los genes de interés y portan en sus extremos 5' secuencias homólogas a las regiones que preceden y siguen al sitio donde se desea dirigir la inserción en el vector a utilizar. Esta técnica utiliza luego el fragmento amplificado flanqueado con las secuencias de homología de interés como "megacebador" en una segunda amplificación junto con el plásmido a clonar linealizado.

Para el diseño de los oligonucleótidos denominados F (del inglés *forward*, sentido) se consideraron entre 28 y 30 bases corriente arriba del comienzo del sitio polylinker del plásmido en el marco de lectura del promotor AOX1, y se le agregó en su extremo 3' las primeras 25 bases correspondientes al gen a clonar. Para el diseño de los oligos R (del inglés *reverse*, anti-sentido) se utilizó en la región 5' la secuencia homóloga a las 30 bases corriente abajo del codón de terminación incluido en el plásmido, manteniéndose las colas de histidinas pertenecientes a los genes y eliminándose de esta manera las del plásmido. En este caso la secuencia agregada en el extremo 3' corresponde a las últimas 25 bases del gen a clonar.

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados utilizando el software Serial Cloner, versión 2.1. La **tabla VI** muestra la secuencia de cada oligonucleótido empleado y su aplicación.

Para la amplificación de los genes de interés la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevo a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 5 µL de Pfu PCR buffer 10X (Invirtogen), 1 µL de dNTPs 10mM cada uno, 1 µL de cada cebador 10 µM, 1 µL de ADN plasmídico (proveniente de miniprep) y 1 µL de Pfu ADN Polimerasa X u/µL (Invitrogen). Se utilizó la enzima Pfu ADN polimerasa ya que esta tiene actividad exonucleasa 3' → 5' con corrección de lectura que garantiza una mayor fidelidad al amplificar, necesario en este caso ya que cualquier error de bases podría afectar la correcta expresión de la proteína. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización inicial (1 minutos a 95 °C), seguido de 25 ciclos, los cuales consistieron de: 30 s a 95 °C, 1 min a 58 °C y 1 min a 72 °C. Por último, una etapa final de 5 minutos a 72 °C. Se analizó el producto de la amplificación en geles de agarosa, y luego se utilizó el GenElute PCR Clean-up kit (Sigma) para purificar el megacebador amplificado.

Para el RF clonning el protocolo de PCR fue ajustado de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la enzima Phusion High-Fidelity DNA polimerasa (Finnzymes, New England Biolabs). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µL conteniendo una mezcla de: 1x Phusion HF buffer, 200 µM

de cada dNTP, 200 ng del megacebador, 1 Unidad de Phusion ADN polimerasa, 40 ng de ADN plasmídico. Las condiciones de la amplificación fueron: 98 °C durante 30 s, seguido de 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min. Por último un ciclo de 7 min a 72 °C.

Se analizaron 9 µl del amplificado en gel de agarosa (ver 3.2.4) y al detectarse presencia de amplificado se procedió a digerir 21 µl de la reacción con la enzima *DpnI* Fast Digest (Fermentas Life Sciences) según indicaciones de fabricante y se transformaron células *DH5 competent cells subcloning efficiency* (Invitrogen, 18265-017) por shock térmico siguiendo las instrucciones del proveedor. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en LB-agar con zeocina (25 µg/ml). Se tomaron colonias positivas, se extrajo el ADN plasmídico (Pure link Hipure Plasmid Filter Midiprep Kit de Invitrogen, K210014) y la presencia del inserto en los plásmidos fue confirmada por PCR (utilizando el protocolo de amplificación idéntico al utilizado para la amplificación de los genes de interés) y posteriormente se cuantificaron y analizaron los plásmidos clonados por secuenciación (ver 3.2.5 y 3.2.6).

3.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de las distintas reacciones de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa entre 0,8-1% (g/L) dependiendo del rango de tamaño de los fragmentos a resolver. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1x (TAE 10x: Tris-HCl 0,4M, EDTA 50mM pH 8,0 y ácido acético hasta pH 7,2) conteniendo 20 µg de BrEt por cada mL de agarosa. El gel fue corrido a 90 V en buffer TAE. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador UV. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311).

3.2.5 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó en el espectrofotómetro de gota (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La concentración de ADN se calculó a partir de la medida de su absorbancia (A) a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 µg/mL de ADN doble hebra. Para estimar la pureza de la muestra se determina también la $A_{280\text{nm}}$ (longitud de onda a la que presentan un máximo de absorción las proteínas). Se consideró que el ADN se encontraba con una pureza aceptable cuando se obtiene una relación de A_{260}/A_{280} de 1,8 o superior.

3.2.6 Secuenciación

Los plásmidos generados fueron secuenciados por el servicio de secuenciación automática (Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems). Las secuencias se revisaron manualmente y se editaron con el programa Serial Cloner versión 2.1.

3.2.7 Preparación de *P. pastoris* electrocompetentes

Se inició un precultivo de 5 mL de medio YPD a partir de una colonia aislada de placa y se dejó toda la noche a 30 °C. Se inocularon 500 mL de medio YPD en un matraz de 2 Lts. con 0.5 mL del precultivo y se dejó crecer hasta una DO_{600} entre 1.3-1.5. Se centrifugaron las células a 1500 g por 5 min a 4 °C. Se resuspendieron las células en 500 mL de agua MilliQ fría y se repitió la centrifugación. Luego se resuspendieron en 20 mL de sorbitol 1 M frío, se volvieron a centrifugar en iguales condiciones para finalmente resuspender el pellet celular en 1 mL de sorbitol 1 M frío para obtener un volumen final de aproximadamente 1.5 ml. Las células se mantuvieron en hielo hasta ser utilizadas.

3.2.8 Transformación de *P. pastoris* por electroporación

Todas las electroporaciones fueron realizadas en cubetas de 0,2 cm. Se utilizó el protocolo para transformación de levaduras (*Yeast protocol*) de la electroporadora Gene Pulser Xcell de BioRad, que consiste en un pulso de 1500V por 5.0 milisegundos para 80 μ L de levaduras electrocompetentes. En todas las ocasiones se electroporó con 5 μ g de ADN (en 5 μ l de agua MilliQ), el cual se dejó incubar 5 min en hielo previo a realizar el pulso junto con las levaduras dentro de la cubeta. Se le agregó 1 mL de sorbitol 1 M al instante después de cada electroporación, se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL y se dejaron recuperar durante 1 h a 30 °C sin agitación. Pasado el tiempo de recuperación se sembraron en placas con medio YPDS conteniendo 100 μ g/ml de zeocina diluciones crecientes (10, 25, 50, 100 y 200 μ l) y se dejaron incubar por 2-3 días en estufa a 30 °C. Se calculó la eficiencia de transformación como número de colonias zeocina resistentes obtenidas por μ g de ADN plasmídico utilizado.

3.2.9 Selección de transformantes múltiples

Las colonias resistentes a 100 μ g/ml de zeocina obtenidas de la transformación fueron repicadas en placas de YPDS con concentraciones crecientes de zeocina (máximo 2000 μ g/ml). Se consideraron como transformantes múltiples aquellas colonias que presentaban un rápido crecimiento en

presencia de la máxima concentración de zeocina. Los transformantes fueron almacenados a -80 °C en medio YPD con 20% de glicerol.

3.2.10 Expresión intracelular de Jaburetox en P. pastoris

Para realizar la inducción de los genes bajo control del promotor AOX1 se inoculó un precultivo de 25 mL de medio MGY con una colonia aislada de placa y se dejó crecer a 220 rpm y 30 °C hasta una DO₆₀₀ entre 4-6 (aproximadamente 18 hs). Las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 3000 g y resuspendidas en medio MM a una DO_{600nm} de 1. Cada 24 hs se agregó metanol hasta una concentración final de 0,5%. Se tomaron muestras de 1 mL de cultivo a las 0, 24, 48, 72 y 96 hs, se centrifugaron las células durante 5 min a 3000g y se almacenaron a -80 °C.

Para la expresión constitutiva de los genes bajo control del promotor GAP se inoculó un precultivo de 10 mL de medio YPD y se dejó crecer a 220 rpm y 30 °C toda la noche. Luego se utilizó 0,1 mL del precultivo para inocular 50 mL de medio YPD en un matraz de 250 mL y se dejó creciendo a 220 rpm y 30 °C. Al igual que en el caso anterior se tomaron muestras de 1 mL de cultivo a las 0, 24, 48, 72 y 96 hs, se centrifugaron las células durante 5 min a 3000 g y se almacenaron a -80 °C hasta ser utilizadas para analizar la expresión por Western blot.

3.2.11 Extracción de proteínas de P. pastoris para análisis por Western blot.

Por cada mL de cultivo centrifugado, se agregaron 100 µl de buffer de extracción (fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 1mM, EDTA 1 mM y glicerol 5%) y un volumen equivalente de perlas de zirconia de 0,7 mm de diámetro (BioSpec Products, 1109107zx). Se colocaron las muestras en beadbeater y se le aplicaron 8 ciclos de 30 segundos de agitación con 30 segundos en hielo. Pasado ese tiempo se centrifugaron las muestras a 17000 g y el sobrenadante fue cuantificado por BCA y conservado a -20 °C en buffer de muestra 2x hasta ser utilizados. Previos a ser cargados en los SDS-PAGE las muestras se hirvieron 10 minutos a 95 °C. Los ensayos de Western blot se realizaron de manera semejante que para *S. cerevisiae* (ver 3.1.5 de esta sección).

3.3 Estudio de la acción de Jaburetox y levaduras productoras de Jaburetox en *P. guildinii* y *A. aegypti*.

3.3.1 Bioensayos en larvas de Aedes aegypti

Los experimentos en *A. aegypti* se realizaron en colaboración con Mónica Moreira en el laboratorio de Bioquímica de Vectores de Doenças, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Para ensayar la toxicidad de las muestras se utilizaron larvas de cepas Rockefeller en estadio L3. Se eligió el estadio L3 porque los estadios anteriores son susceptibles a las condiciones del ensayo debido a su menor tamaño y desarrollo.

Para montar el ensayo, primero se pesaron los mg de levaduras o *E. coli* correspondientes para cada tratamiento, se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL junto con 3 mL de agua destilada y se centrifugaron 5 minutos a máxima velocidad (5000 g) de manera de generar un pellet compacto en el fondo de los tubos. Luego suavemente se colocaron en la superficie acuosa 25 larvas por tubo y se taparon los falcons con tul sellado con bandas elásticas. Los experimentos fueron realizados en triplicado y se mantuvieron a 28 °C con un fotoperíodo de 8:16 hs (claro/oscuras). Se acompañó y registró diariamente el desarrollo y supervivencia de los individuos durante una semana.

El modelo planteado para el análisis estadístico es un diseño completamente al azar (DCA) ya que se consideró que todas las repeticiones eran homogéneas. Se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software GraphPad 5 (GraphPad software, Inc. USA. 2012) y las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $p < 0.05$. Para presentar los resultados, las gráficas fueron realizadas considerando los porcentajes de mortalidad en función de los días de transcurrido el ensayo. Los resultados fueron expresados como la media \pm SD de n observaciones.

3.3.2 Bioensayos en Piezodorus guildinii

Los trabajos experimentales en *P. guildinii* fueron ejecutados en el laboratorio de Entomología de la Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni (EEMAC) ubicado en el departamento de Paysandú (Ruta 3, km 365). El período experimental se extendió entre los meses de diciembre y marzo entre los años 2012-2014. Debido a la dificultad de mantener una colonia de laboratorio, los individuos utilizados en los experimentos fueron en todos los casos colectados de campo en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*) (Fabales: Fabaceae) y soja (*Glycine max*) (Fabales: Fabaceae) sin tratamientos previos con insecticidas. Los adultos colectados fueron llevados al laboratorio y

colocados en recipientes plásticos con dimensiones 30 x 15 x 10 cm y mantenidos a 25 °C con un fotoperíodo de 12:12 hs (claro/oscurο)

3.3.2.1 *Ensayos de inyección*

Siguiendo protocolos descritos para otros insectos (Simon 2008), se intentó inicialmente administrar la entomotoxina mediante inyecciones en la hemocele. Esta forma de administración es habitualmente usada en otros insectos modelo como forma rápida y eficiente de probar toxicidad. Intentamos inyecciones en diversas partes del cuerpo (como ser protórax, abdomen inferior o placa posterior) e incluso se ensayaron las inyecciones con y sin distintos buffer de manera de encontrar alguno que no resultara tóxico para los insectos. En todos los casos se inyectaron 1.5 µl de buffer utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl de volumen total (Sigma-Aldrich, modelo 20907-U).

3.3.2.2 *Ensayos de administración por vía oral*

Se diseñó luego un protocolo para administración vía oral de la proteína. Para ello a los individuos adultos colectados de campo se les ofreció únicamente un disco de 3 cm de diámetro embebido con 200 µl de la muestra proteica (concentración 0,7 mg/ml) sin alimento u otra fuente de hidratación. Cada 12 horas se reemplazó el disco por uno nuevo, con muestra fresca. Como control se realizó un tratamiento en el que se les ofreció a los insectos discos embebidos en el mismo buffer de la proteína pero sin la misma, de manera de controlar cualquier efecto tóxico que pudiera ejercer el buffer utilizado sobre los insectos. Se incluyó además un tratamiento testigo, a los que les ofreció como alimento vainas de *Pisum sativum* (chauchas) y se les colocó además algodón humedecido en agua destilada en el recipiente. Para cada tratamiento se colocaron entre 30 y 35 insectos en recipientes plásticos de 30 cm de diámetro por 15 cm de altura. Se realizaron cuatro ensayos independientes entre los meses de enero y febrero de los años 2013 y 2014, cada uno con dos o tres repeticiones dependiendo de la disponibilidad de insectos. La mortalidad de los individuos se registró diariamente.

3.3.2.3 *Estadística*

Con propósito únicamente descriptivo, se utilizó la función de Kaplan Meier para graficar las curvas de supervivencia de los individuos bajo distintos tratamientos en el tiempo (Kaplan and Meier 1958). Para el análisis de los datos, se utilizó el modelo de Regresión de Cox, que permite evaluar de entre un conjunto de variables independientes (en este caso los tratamientos aplicados), cuáles de ellas tienen una relación significativa sobre la probabilidad de riesgo de que suceda un

evento (muerte) durante el tiempo de estudio. Como las muestras utilizadas para cada ensayo independiente no eran homogéneas entre sí, ya que existían diferencias entre los estados de los individuos colectados en los diferentes meses (dependiendo de las temperaturas, precipitaciones, etc, del momento de la colecta) se consideró en el modelo como variable dependiente la fecha del ensayo al cual cada insecto pertenecía. Esto se incluyó de manera de eliminar del resultado final el efecto producto de la correlación entre los individuos pertenecientes a un mismo ensayo. Para los análisis utilizamos el software R (Team RC: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2012).

3.4 Caracterización bioquímica del estado activo de Jaburetox en las distintas etapas post-purificación.

3.4.1 Cepa de E.coli y vectores de expresión

El vector pET 23-a transformado con la secuencia Jaburetox-V5, unida a una cola de seis histidinas en su extremo C-terminal (Postal, Martinelli et al. 2012) y las cepas para su expresión: BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene), fueron cedidos por la Dra. Celia Carlini (Laprottox, UFRGS, Porto Alegre Brasil) con quien colaboramos durante este proyecto (ver **tabla I**).

3.4.2 Transformación de cepas BL21

Se utilizó 1 mL de cultivo *O.N* (medio LB con 40 µg/mL de cloranfenicol) por transformación. Se centrifugaron las células a 4 °C durante 1 min a 1700 g. Se descartó el medio y se resuspendieron en 0,5 mL de CaCl₂ 0,1 M frío. Se centrifugaron a 1700 g durante un minuto y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet de células en 100 µl de CaCl₂ 0,1M y se incubaron las células con 5 µl del plásmido (500 ng aproximadamente) en hielo durante 30 minutos. Se realizó un shock térmico de 2 minutos a 42 °C seguidos de 5 minutos en hielo. Las células transformadas se incubaron en medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM) durante 1 hora y luego se seleccionaron las células transformadas en placas de LB-agar conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y 40 µg/mL de cloranfenicol. El control negativo se realizó sin ADN.

3.4.3 Purificación de proteínas de E. coli

La inducción y purificación de Jaburetox de *E. coli* fue realizado siguiendo el siguiente protocolo: 500 mL de medio LB (bactotripton 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl10g/L, pH 7,0) conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y 40 µg/mL de cloranfenicol fueron inoculados con 5 mL de precultivo crecido toda la noche a 37 °C. Las células fueron crecidas a 220 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.6-0,8 y se les adicionó IPTG (concentración final 1 mM). Pasadas las 3 hs las células fueron centrifugadas, lavadas en buffer fosfato 20 mM pH=7 y luego resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM). Previo a la purificación la suspensión fue sonicada, centrifugada y el sobrenadante se cargó en columnas HisTrap de GE Healthcare (1 ml) previamente equilibradas en buffer de lisis. Las columnas fueron lavadas con el mismo buffer conteniendo 50 mM de imidazol y la proteína fue eluída en buffer con 200 mM de

imidazol, cuantificada por Bradford y por último dializada. Una masa molecular de 11,128 Da (ExPASy, herramienta ProtParam) fue considerada para Jaburetox-V5.

3.4.5 Cromatografía de Exclusión Molecular

Se utilizaron columnas Superdex 75 y 200 (10/300, GE Healthcare) conectadas al equipo AKTA-purifier (GE Healthcare). En todos los casos las corridas cromatográficas fueron realizadas de la misma manera: se equilibró la columna en buffer Tris-HCl 10 mM pH=7, se fijó el flujo en 0.5 mL por minuto y se cargaron 500 µl de muestra a concentración 0.5 mg/ml. Para la elución se utilizó el mismo buffer.

Capacidad de resolución de Superdex 75: 13 a 67 kDa.

Capacidad de resolución de Superdex 200: 43 a 2000 kDa.

3.4.6 Análisis estadístico

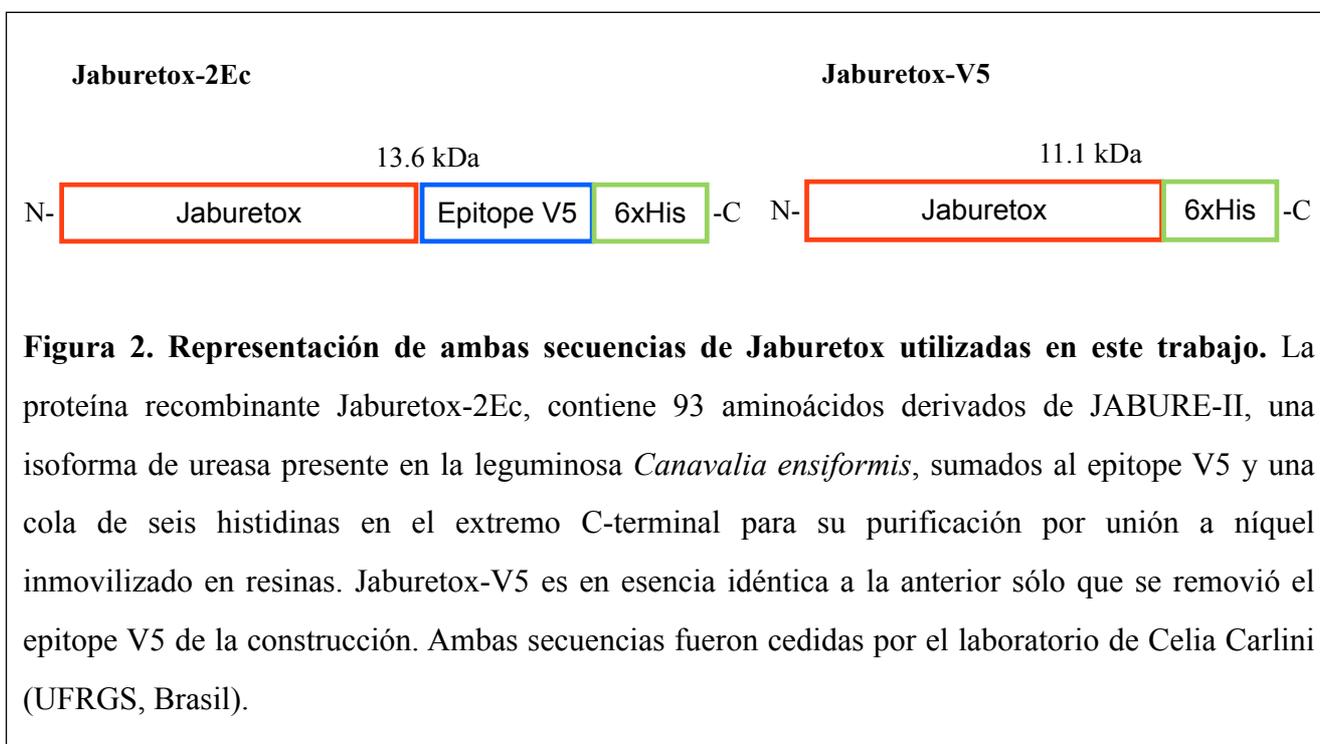
Todos los experimentos fueron realizados por triplicados. Los datos fueron evaluados utilizando “one-way” ANOVA seguidos del test múltiple de Tukey. En todos los casos un p-valor < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron utilizando los programas GraphPad Prism y R-studio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción de cepas de levaduras modelo productoras de Jaburetox.

4.1.1 Construcción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* productoras de Jaburetox

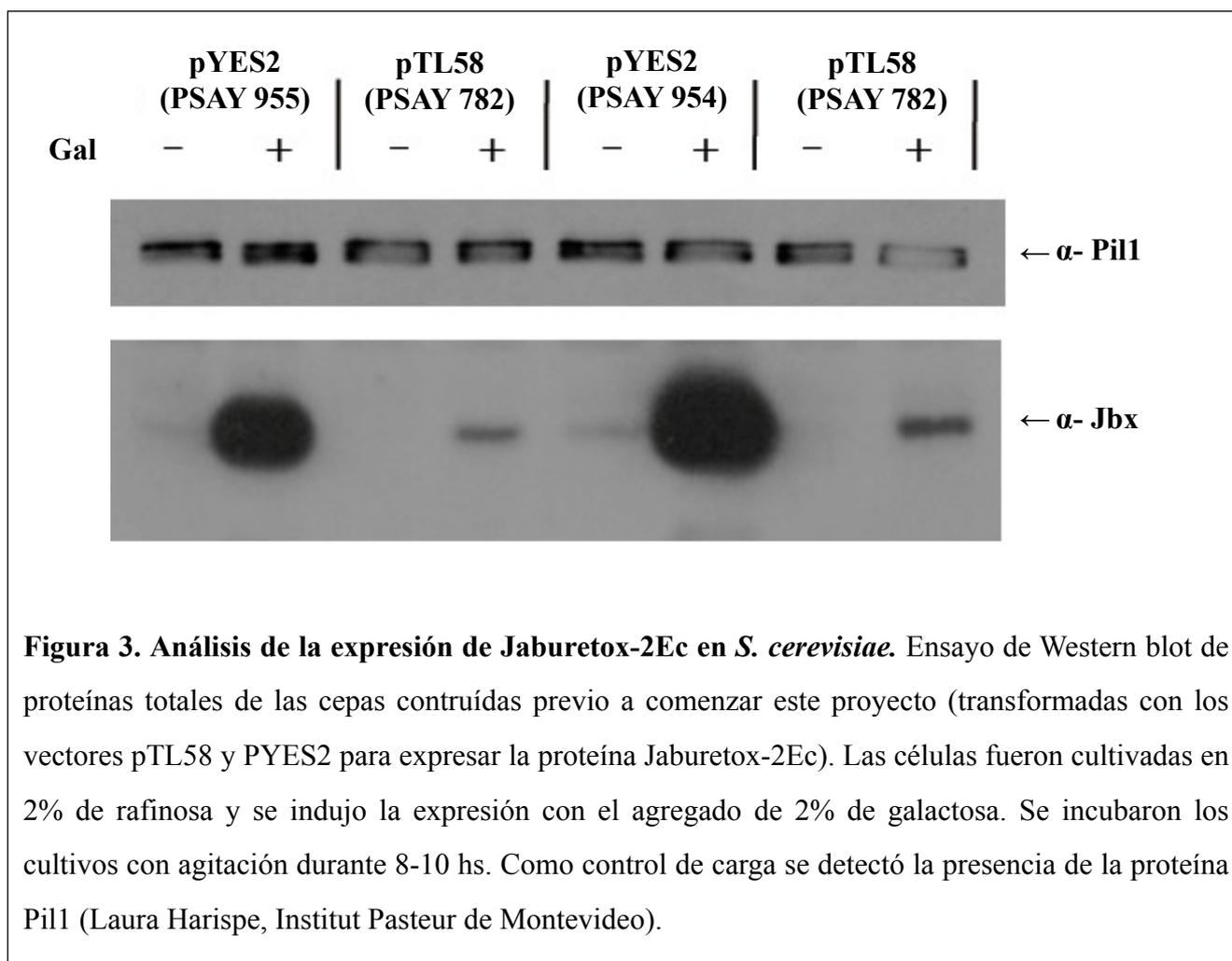
Este trabajo se enmarca dentro del proyecto “Desarrollo de levaduras con propiedades insecticidas” (fondo INNOVAGRO 2009, FSA-2009-1405, ANII). Al momento de iniciar esta maestría, los trabajos previos realizados dentro del mencionado proyecto habían producido cepas haploides de *S. cerevisiae* transformadas para expresar los genes de Jaburetox-2Ec o Jaburetox-V5 bajo inducción con 2% de galactosa. La proteína recombinante Jaburetox-2Ec (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007), contiene 93 aminoácidos derivados de JABURE-II una isoforma de ureasa presente en la leguminosa *Canavalia ensiformis*, sumados al epitope V5 y una cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal. A su vez, la proteína recombinante Jaburetox-V5, fue construida posteriormente luego de obtenido un anticuerpo polyclonal anti-Jaburetox y es en naturaleza idéntica, con la diferencia que se eliminó de la construcción el epitope V5 (Postal, Martinelli et al. 2012) (ver **figura 2**).



Ambas secuencias fueron inicialmente clonadas en el vector replicativo de bajo número de copias pTL58 bajo control del promotor inducible por galactosa GAL1 (Pablo Aguilar, Intitut Pasteur de

Montevideo). Sin embargo, posteriormente se decidió utilizar el vector de expresión PYES2 de alto número de copias (Invitrogen, 50 copias por núcleo, ver ANEXO I).

Al analizar la expresión de Jaburetox-2Ec de ambos tipos de transformantes mediante Western blot (**figura 3**) se observó que los niveles de proteína detectados eran al menos 20 veces mayores a partir de las cepas transformadas con pYES2 que aquellas transformadas con pTL58. Para ambos transformantes de Jaburetox-V5, las cantidades de entomotoxina producidas eran prácticamente indetectables mediante este método (resultados no mostrados).



A raíz de estos resultados previos, y con el fin de lograr aún mayores niveles de producción de Jaburetox en levaduras nos propusimos generar nuevas construcciones de ambas secuencias de Jaburetox recodificadas para la óptima expresión en levaduras, ya que las secuencias otorgadas por Celia Carlini fueron obtenidas a partir de la ureasa JBURE-II de *Canavalia ensiformis* y generadas para la expresión de proteína recombinante de *E. coli*. Para esto se obtuvo una secuencia sintetizada

por GenScript (USA) optimizada para la expresión en levaduras donde las modificaciones en la secuencia original fueron realizadas tomando en consideración una variedad de parámetros como ser frecuencia de codones, contenido GC, estructuras secundarias del ARNm, inestabilidad del ARNm, entre otras.

Los genes de Jaburetox-2Ec y Jaburetox-V5 recodificados para la óptima expresión en levaduras (a los que llamamos “optimizados”) se clonaron en la región polylinker del vector para expresión PYES2, bajo el promotor GAL1 inducible por galactosa (clonado realizado por Laura Harispe), y luego fueron transformados químicamente en cepas haploides de *S. cerevisiae*.

Se procedió entonces a caracterizar la expresión de los cuatro transformantes obtenidos: Jaburetox-2Ec y Jaburetox-V5 sin optimizar y optimizados.

4.1.2 Análisis de la expresión y determinación del tiempo máximo de expresión

Para analizar los niveles de expresión de proteínas de las cuatro cepas construidas se cultivaron las células bajo condiciones de expresión (galactosa 2%) y se tomaron muestras de los cultivos a distintos tiempos de inducción. En la **figura 4** se observan ejemplos de los Western blot realizados a partir de 20 µg de proteína total de las muestras tomadas.

Para la construcción Jaburetox-2Ec sin optimizar (**figura 4.a**) observamos que al comenzar la inducción (tiempo 0 hs) se detectó presencia de la entomotoxina, lo que nos estaría diciendo que en las condiciones del precultivo la represión del promotor no es absoluta, ya que habría una pequeña expresión basal del gen. A simple vista se observa que la expresión de Jaburetox-2Ec aumenta entre las 4 y las 8 horas para luego permanecer estable hasta las 11 hs de inducción, tiempo después del cual se observa una disminución de la proteína que continúa hasta las 14 hs.

Para la expresión de Jaburetox-2Ec optimizada (**figura 4.b**) se observó un comportamiento similar al de la construcción sin optimizar, aunque al observar detalladamente comparando tiempo a tiempo, a simple vista puede observarse un leve aumento de la señal detectada de la proteína optimizada, lo que podría significar una mayor cantidad total de entomotoxina en las muestras.

Para Jaburetox-V5 sin optimizar, como se estableció anteriormente, la expresión de la proteína es mínima, siendo escasamente detectada por este método (**figura 4.c**). Sin embargo, para la versión -

V5 optimizada se observa un incremento notorio de la expresión detectándose valores similares a los obtenidos para la construcción 2Ec optimizada (**figura 4.d**).

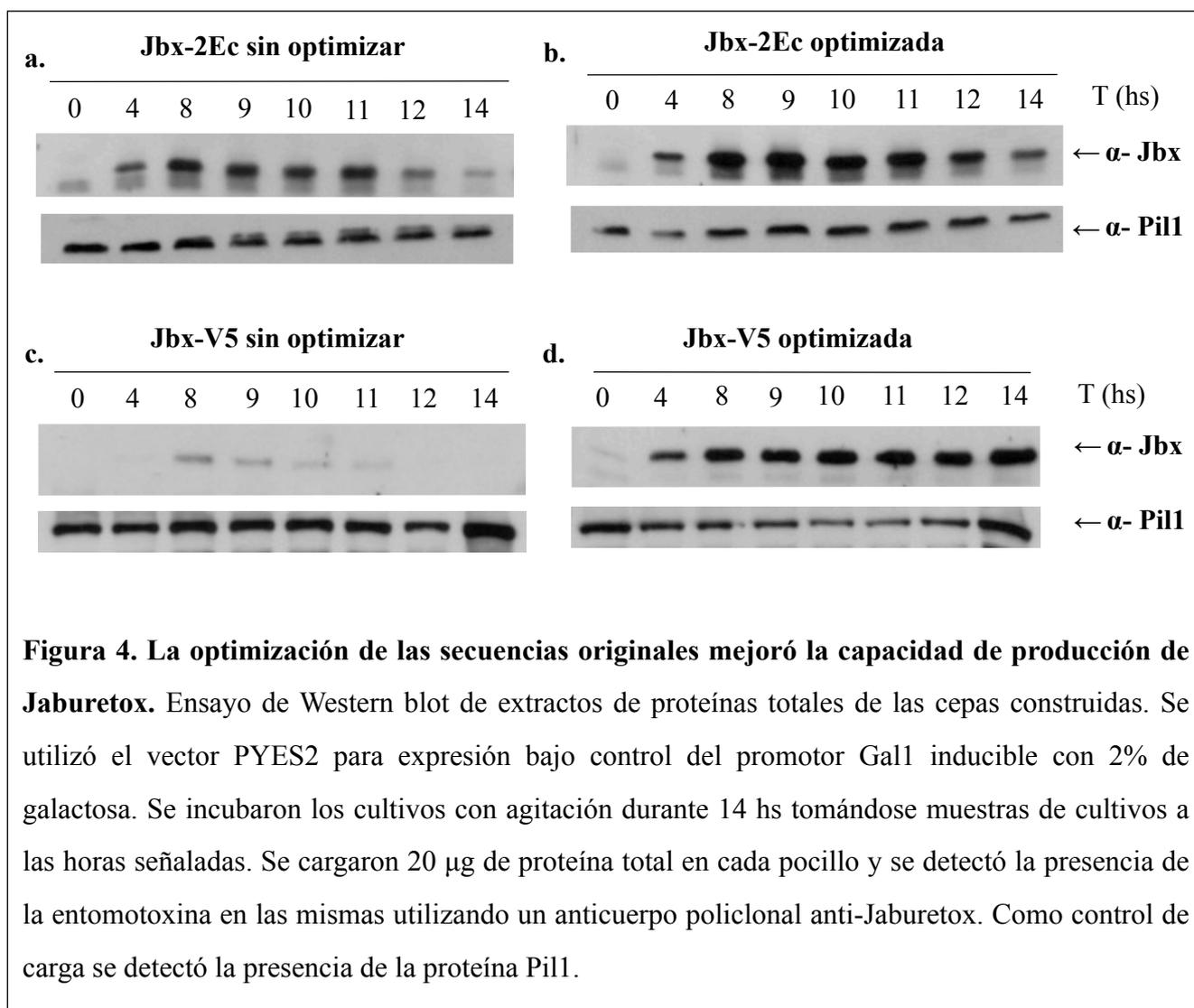


Figura 4. La optimización de las secuencias originales mejoró la capacidad de producción de Jaburetox. Ensayo de Western blot de extractos de proteínas totales de las cepas construidas. Se utilizó el vector PYES2 para expresión bajo control del promotor Gal1 inducible con 2% de galactosa. Se incubaron los cultivos con agitación durante 14 hs tomándose muestras de cultivos a las horas señaladas. Se cargaron 20 μ g de proteína total en cada pocillo y se detectó la presencia de la entomotoxina en las mismas utilizando un anticuerpo policlonal anti-Jaburetox. Como control de carga se detectó la presencia de la proteína Pil1.

Los mismos Western blot se utilizaron a continuación para determinar el tiempo de inducción al que se obtiene el máximo de expresión. Con este fin, las placas radiográficas obtenidas fueron escaneadas y analizadas utilizando la herramienta de análisis de geles del software Image J. Para cada banda obtenida en el gel correspondiente a la entomotoxina, se obtuvo un nivel de intensidad de señal que fue luego normalizado sobre el nivel de intensidad obtenido para el control de carga Pil1. El tiempo con el valor de señal máximo obtenido, para cada construcción, se tomó como 100% y los tiempos restantes se calcularon como porcentajes respecto al máximo. Como se observa en la **figura 5**, en el que se graficaron los porcentajes obtenidos para cada tiempo analizado, para Jaburetox-2Ec y -V5 optimizada el pico máximo se obtuvo a las 8 horas. Para la construcción Jaburetox-2Ec sin optimizar se obtuvieron resultados semejantes a la construcción optimizada, mientras que para la construcción -V5 sin optimizar, no se obtuvieron niveles de señal suficientes

para analizar (resultados no mostrados). En todos los casos la expresión de Jaburetox es de carácter transitorio, pasadas las 8 hs de inducción se observó una disminución de las cantidades de Jaburetox producida, posiblemente debido a una disminución de la concentración de galactosa disponible en el medio de cultivo. Para corroborar esto, podríamos ensayar agregando más galactosa al medio antes del pico máximo de expresión y estudiar si al hacerlo se obtiene una segunda curva de expresión o se logra sostener los niveles máximos de expresión. Una segunda opción podría ser iniciar la expresión utilizando mayores concentraciones iniciales de galactosa (Li, Wang et al. 2000). Otras posibles causas de la disminución en los niveles de proteína detectada pueden ser que las propias células llegadas a la fase estacionaria de crecimiento, pierden capacidad productiva o sufren estrés alterando la correcta expresión o mantenimiento de la proteína heteróloga en el citoplasma celular, o simplemente que las proteínas expresadas tienen una vida media corta y son más fácilmente degradadas pasadas las 8 hs de cultivo.

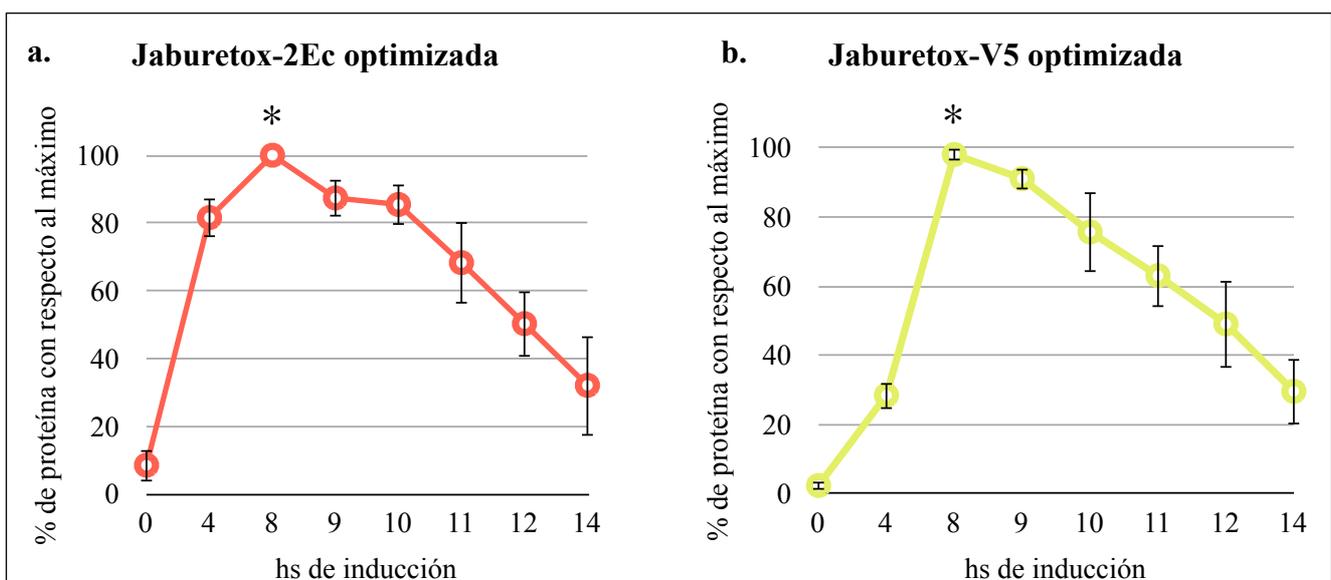


Figura 5. A las 8 hs de inducción se obtiene un rendimiento máximo. Utilizando el software Image J se analizaron los Western blot obtenidos para (a) Jaburetox-2Ec y (b) Jaburetox-V5 optimizadas a distintos tiempos de inducción. Las señales obtenidas para ambas construcciones fueron normalizadas sobre las señales obtenidas para control de carga Pil1. El tiempo con el valor de señal máximo obtenido para cada construcción se tomó como 100% y los tiempos restantes se calcularon como porcentajes respecto al máximo. El experimento se realizó por triplicado y se aplicó el test múltiple de Tukey para corroborar que los máximos obtenidos fueran significativos ($\alpha=0,05$). Se graficó el porcentaje de proteína respecto al máximo obtenido a cada tiempo +/- el error estándar y se indica con (*) aquellos casos en que se registró una diferencia significativa.

Visiblemente los genes optimizados por GenScript lograron aumentar los niveles de expresión. Para la versión -V5, las diferencias observadas entre la versión no optimizada y optimizada fueron dramáticas. Lo que nos llamó la atención, fueron las diferencias observadas en los niveles de expresión entre ambas secuencias no optimizadas, ya que como dijimos anteriormente, estas son en naturaleza exactas salvo por la presencia del epítopo V5. Claramente la presencia del epítopo V5 en la construcción no optimizada provoca un efecto positivo en la expresión que puede ser tanto a nivel del mensajero (aumentando su vida media o eliminando posibles estructuras secundarias que afecten su correcta traducción), a nivel proteico estabilizando la proteína o aumentando su vida media. En este caso, la optimización de la secuencia -V5 logró eliminar eficientemente cualquier impedimento, ya sea a nivel traduccional o transcripcional, para la correcta expresión de la proteína, ya que los niveles finales detectados para ambas secuencias optimizadas fueron similares.

Así hemos podido determinar que, en las condiciones ensayadas, el tiempo de inducción en el que se obtiene un rendimiento máximo es de 8 hs. A partir de aquí, hemos utilizado estas condiciones de inducción para todos los ensayos a realizar con estas proteínas entomotóxicas.

Procedimos entonces a determinar si la expresión de la entomotoxina ejercía algún efecto deletéreo sobre el metabolismo de las levaduras utilizadas como sistema de expresión.

4.1.3 Análisis de la toxicidad de la expresión de Jaburetox

Para analizar si la expresión de la entomotoxina ejercía un efecto tóxico sobre la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, se compararon las capacidades de crecimiento presentada por las cepas construidas y cepas controles transformadas con el vector vacío. Para ello se cultivaron las células en condiciones de inducción y se evaluó el crecimiento (por turbidimetría a 600 nm) presentado al momento de iniciar el cultivo y a las ocho horas. En la **tabla VIII** se muestra el resultado para las cepa productoras de Jaburetox-2Ec y -V5 optimizadas. Los resultados muestran que la proteína expresada intracelularmente no resulta tóxica para la levadura ya que no se observó inhibición de la capacidad de crecimiento de los cultivos en comparación con el control y por ende que este organismo es un sistema compatible con la expresión de la entomotoxina. El resultado obtenido fue semejante para las construcciones no optimizadas (resultados no mostrados).

Tabla VIII. Análisis de la toxicidad de expresión de Jaburetox-2Ec y -V5 optimizada en cepas de *S. cerevisiae*. Se evaluó el crecimiento celular por turbidimetría a 600 nm. Para esto se realizaron inducciones por triplicado de las cepas utilizadas para la expresión de la entomotoxina y como control se utilizó una cepa transformada con el vector PYES2 vacío. Se tomaron muestras de cultivo al inicio y pasadas las 8 horas de iniciada la inducción y se midió la Abs = 600 nm.

Tiempo (hs)	DO promedio (n=3)	
	0	8
Δ Jbx	0,4 ± 0	4,2 ± 0,7
Jaburetox-2Ec opt.	0,4 ± 0	4,2 ± 0,7
Jaburetox-V5 opt.	0,4 ± 0	4,0 ± 0,5

4.1.4 Fraccionamiento sub-celular

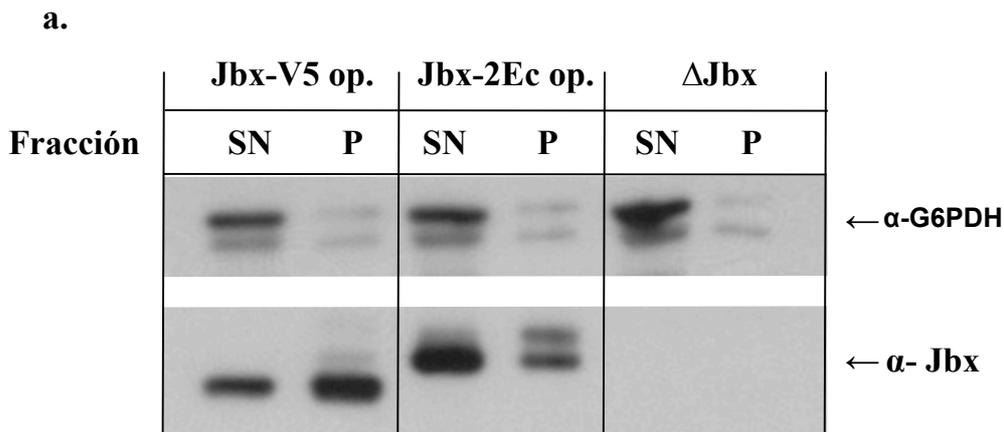
Jaburetox es una proteína que para ejercer su actividad entomotóxica debe encontrarse en forma soluble en distintas soluciones (Barros, Stassen et al. 2009). Así, es de interés determinar si Jaburetox al ser producida en levaduras permanece soluble y por lo tanto asociada a una fracción citosólica, o forma agregados que eventualmente pueden precipitar y/o asociarse a fracciones insolubles de los extractos celulares. Para ello se realizaron experimentos de fraccionamiento sub-celular y detección por Western blot de Jaburetox-2Ec y -V5 optimizadas, en fracciones solubles y asociadas a membrana, de manera de determinar si la proteína se expresa de manera soluble en el citoplasma. Para esto las células de cultivos inducidos fueron concentradas y lisadas para luego someter estos extractos a centrifugaciones sucesivas hasta obtener, en última instancia, dos fracciones: citoplasmática soluble (SN) e insoluble (P). Se detectó la presencia de Jaburetox y de la proteína citoplasmática G6PDH (como control de la fracción soluble) en las muestras obtenidas por Western blot y luego utilizando el software Image J se determinó el porcentaje de proteína presentes en ambas fracciones para cada construcción.

En la **figura 6.a** se muestra un ejemplo de Western blot obtenido. Al observar la señal obtenida producto de la proteína citoplasmática G6PDH vemos que para las tres cepas la gran mayoría se encuentra, como era de esperar, en la fracción SN. Esto nos estaría indicando que el protocolo utilizado para separar la fracción citoplasmática del resto de los residuos insolubles de las levaduras fue correcto. De todas maneras se observan bandas tenues en la fracción P, indicando que una

pequeña fracción del contenido citoplasmático quedó retenido en esta fracción durante las sucesivas centrifugaciones.

Por otro lado, para la proteína Jaburetox-V5, se observa que la banda con mayor intensidad se obtuvo en la fracción P, indicando que esta co-purifica principalmente con la fracción no soluble. Por el contrario, la versión -2Ec de la proteína, se detectó mayormente en la fracción SN, con lo cual nos estaría indicando que esta co-purifica en su mayoría en la fracción soluble.

Procedimos a analizar los resultados obtenidos en el software Image J, de manera de poder determinar qué porcentaje de la entomotoxina de ambas construcciones se estaba expresando de forma soluble. En la **figura 6.b** se muestra la tabla de resultados obtenidos. Se comprobó que para Jaburetox-2Ec al menos un 70% de la proteína expresada co-purifica con la fracción soluble, mientras que para Jaburetox-V5, 70% de la proteína co-purifica con la fracción no soluble. Asimismo se determinó que mediante el método de fraccionamiento utilizado, entre un 12 y 15% del contenido citoplasmático soluble queda retenido en la fracción P (determinado utilizando los niveles de la proteína G6PDH presentes en dicha fracción), pudiéndose deducir entonces que probablemente los porcentajes de Jaburetox-2Ec soluble en la cepa utilizada sean próximos al 80%, mientras que el porcentaje de Jaburetox-V5 soluble ronde el 40%.



b.

Proteína	Fracción	JBX	G6PDH
Jaburetox-2Ec optimizada	P	28 ± 9 %	12 ± 2 %
	SN	72 ± 9 %	88 ± 2 %
Jaburetox-V5 optimizada	P	70 ± 5 %	14 ± 4 %
	SN	30 ± 5 %	86 ± 4 %

Figura 6. Jaburetox-2Ec co-purifica mayoritariamente con la fracción soluble, mientras que Jaburetox-V5 lo hace con la fracción no soluble. Las levaduras inducidas para expresar la entomotoxina fueron lisadas y sometidas a sucesivas centrifugaciones hasta obtener una fracción citoplasmática (SN) y un pellet (P) con la fracción insoluble. El ensayo se realizó por triplicado y el control fue realizado con levaduras transformadas con el vector vacío (Δ Jbx). **(a)** Se detectó la presencia de la proteína en las diferentes fracciones obtenidas por Western blot. Se detectó a su vez la presencia de la proteína citoplasmática G6PDH como control del fraccionamiento. **(b)** Las señales emitidas fueron cuantificadas utilizando la herramienta de análisis de imágenes del programa Image J. Se cuantificaron y sumaron las señales detectadas para ambas fracciones, y luego se calculó qué porcentaje del total representaba la fracción SN y la fracción P. Estos experimentos fueron realizados por triplicados obteniéndose en todos los casos resultados similares; aproximadamente el 70 % de Jaburetox-2Ec optimizada copurifica con la fracción soluble mientras que el 70% de la proteína -V5 se obtuvo en la fracción insoluble.

4.1.5 Cuantificación del pico máximo de expresión

Una vez determinado el tiempo al cual la expresión de la proteína era máxima, habiendo establecido que la expresión a dicho tiempo no resulta tóxica para las levaduras y por último qué porcentaje de las proteínas analizadas co-purifica con la fracción soluble, procedimos a cuantificar los picos máximos de expresión. Como se explica en materiales y métodos la cuantificación la realizamos mediante Western blot.

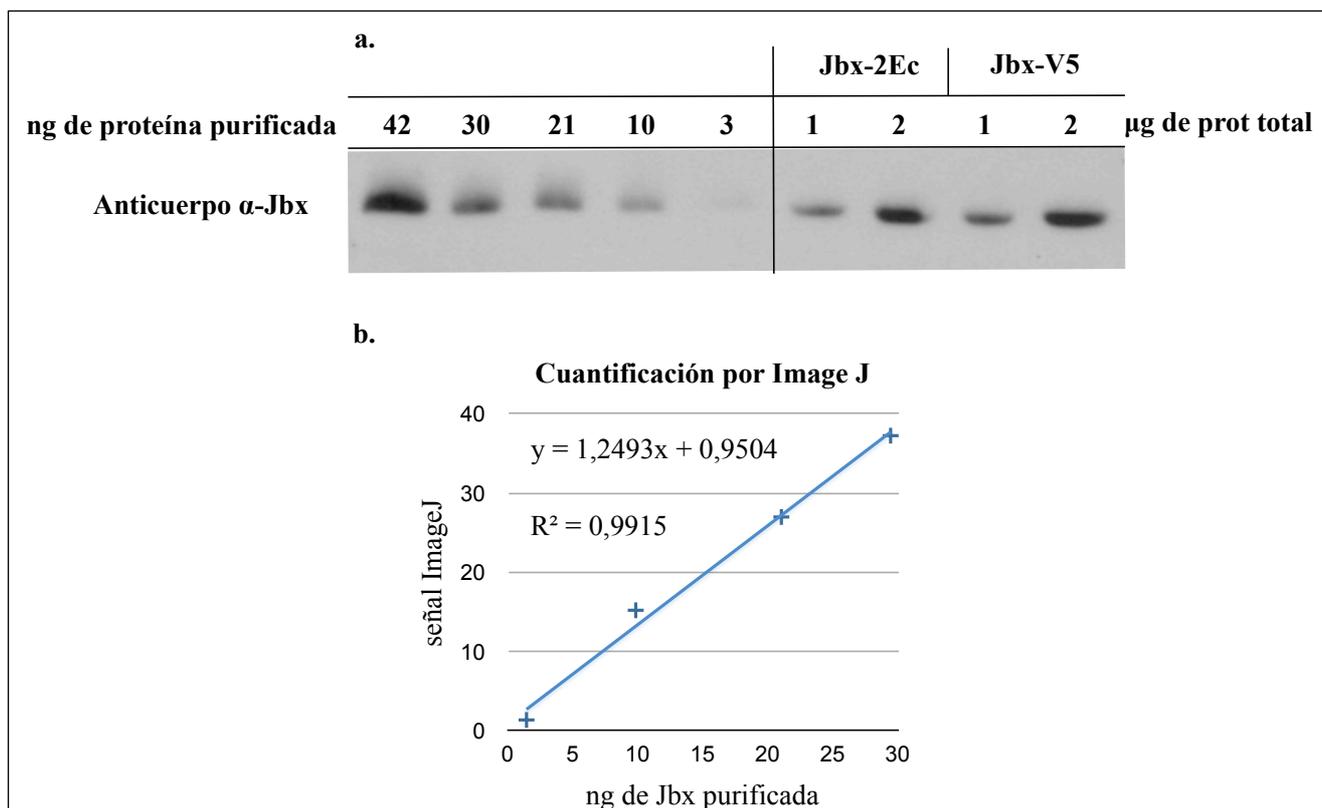


Figura 7. Cuantificación por Western blot de la expresión al tiempo máximo de inducción de Jaburetox-2Ec y -V5 optimizadas. (a) Ejemplo de Western blot realizado para cuantificar los ng de entomotoxina presentes en los extractos de levaduras. Se cargaron en SDS-PAGE 15% cantidades conocidas de proteína purificada de *E. coli* (42, 30, 21, 10 y 3 ng) y 1 y 2 µg de proteína total de extractos de levaduras a cuantificar. Las placas obtenidas fueron escaneadas y analizadas utilizando la herramienta de análisis de geles del software Image J. **(b)** Se determinó el rango de linealidad de la señal obtenida para las concentraciones de proteína conocidas y se utilizaron estos datos para construir la curva de calibración de señal emitida en función de la cantidad de proteína cargada (ng). Para conocer la cantidad de Jaburetox de las muestras de levaduras, se interpolaron en la curva de calibración los datos de señal emitida por estas muestras y se calculó la concentración de proteína en el volumen de muestra utilizado. El experimento se realizó por triplicado.

En la **figura 7** se muestra el resultado de un Western blot realizado para cuantificar extractos totales de las cepas productoras de Jaburetox-2Ec y -V5 optimizada. Como se observa en la **figura 7.b** en la curva de calibración construida con la proteína purificada de *E. coli* se obtuvo una recta con $R=0,9915$, lo cual nos indica que el ajuste lineal realizado a las señales emitidas por las muestras de proteína purificada de *E. coli* es correcta. Se procuró que la señal emitida por ambas muestras de Jaburetox-2Ec y Jaburetox-V5 optimizadas quedaran dentro del rango lineal obtenido para luego, utilizando la ecuación de la gráfica obtenida, calcular los ng de proteína de los extractos utilizados. Se determinó que la cantidad de proteína expresada para la versión 2Ec es de aproximadamente $10,5 \pm 1$ ng por μg de proteína total y $11,7 \pm 1$ ng por μg de proteína total para -V5. En la **tabla IX** se presenta un resumen de los resultados obtenidos.

Hay que considerar que los extractos de proteína total utilizados para realizar las cuantificaciones fueron obtenidos utilizando el método de extracción desnaturalizante con Urea 8M-HEPES 50 mM, mediante el cual se obtiene una única fracción final que contiene tanto la fracción proteica soluble e insoluble. Es por esto que hay que considerar que aproximadamente un 80 % de Jaburetox-2EC y un 40% de -V5 cuantificados serían los pertenecientes a una fracción soluble. Ajustando los datos por lo anterior dicho, podríamos decir entonces que la cantidad de proteína soluble presente al tiempo máximo de inducción serían aproximadamente 8.4 ± 1 ng por μg de proteína total para Jaburetox-2Ec y 4.7 ± 1 ng por μg de proteína total para Jaburetox-V5.

Para el caso de *E. coli* se determinó que la cantidad de proteína expresada para la versión 2Ec es de aproximadamente 58 ± 8 ng por μg de proteína total, lo cual significaría que en este sistema se obtuvieron aproximadamente unas 7 u 8 veces más proteína que en *S. cerevisiae*. En *E. coli* normalmente se obtienen rendimientos superiores (pudiendo representar entre un 15-30% de la proteína total presente en la célula), por lo que usualmente se elige este sistema para expresar altas cantidades de proteínas (Ferrer-Miralles and Villaverde 2013). Por lo tanto, el rendimiento observado en *S. cerevisiae* en comparación con *E. coli* en este caso está dentro de los límites esperados.

Tabla IX. Resumen de resultados obtenidos para las cuantificaciones de las distintas cepas productoras de Jaburetox por μg de proteína total y por mg de liofilizado. Para calcular los μg de Jaburetox por mg de liofilizado de levadura se realizaron tres inducciones independientes de 25 mL de cultivo y pasadas las 8 hs de inducción se tomaron 3 mL de muestra para realizar la extracción y cuantificación de Jaburetox total presentes en la muestra por Western blot (de manera idéntica a la anterior, ver figura 5). El resto del cultivo se centrifugó y liofilizó durante 48 hs. El pellet de células liofilizadas fue entonces pesado y conociendo los μg de Jaburetox-2Ec presentes en 3 ml, se calculó el total de entomotoxina presente en los restantes 22 mL de medio y se dividieron según los mg de liofilizado obtenidos de manera de calcular los μg de proteína por mg de liofilizado.

Organismo	Proteína	ng Jbx/ μg de proteína total	μg Jbx/mg de liofilizado
<i>S. cerevisiae</i>	Jaburetox-V5	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	Jaburetox-2Ec	$7,1 \pm 2,6$	-
<i>S. cerevisiae</i>	Jaburetox-2Ec optimizada	$10,5 \pm 1$	$4,1 \pm 1$
<i>S. cerevisiae</i>	Jaburetox-V5 optimizada	$11,7 \pm 1$	-
<i>E. coli</i>	Jaburetox-2Ec	58 ± 8	$11,3 \pm 2$

4.1.6 Producción de Jaburetox-2Ec por unidad de biomasa

Como se estableció anteriormente, uno de los objetivos de este proyecto es estudiar la acción de las levaduras productoras de Jaburetox en *A. aegypti*. Con este fin, además de determinar la cantidad de entomotoxina que presentan las células de *S. cerevisiae* por μg de proteína total, nos interesaba determinar la cantidad de proteína presente por unidad de biomasa, para poder posteriormente calcular los mg de liofilizado celular a utilizar en los bioensayos a realizar.

Como se determinó que Jaburetox-V5 optimizada se expresa en su mayoría de forma insoluble resolvimos cuantificar las cantidades de proteína producida por unidad de biomasa únicamente de la cepa productora de Jaburetox-2Ec. En la **tabla IX** se muestran el resultado obtenido, pudiéndose

concluir que dicha cepa produce en promedio 4 ± 1 μg de Jaburetox por mg de liofilizado, valor que resulta comparable al determinado para *E. coli*: 11 ± 2 μg de Jaburetox por mg de liofilizado.

4.1.8 Determinación de la actividad funguistática de la proteína producida en *S. cerevisiae*

Los resultados descriptos indican que las cepas de levaduras construidas son capaces de producir entomotoxina soluble, sin embargo resta determinar si la misma es activa. Al iniciar este proyecto no contábamos con un protocolo en nuestro laboratorio para evaluar la actividad de la entomotoxina. En los laboratorios donde se trabaja con esta proteína, se cuenta habitualmente con colonias de insectos susceptibles (como ser *Disdercus peruvianus* o *Rhodnius prolixus*) los cuales son utilizados rutinariamente para medir la actividad de distintas muestras de entomotoxina en una suerte de “control de calidad”.

Al principio del año 2013, el grupo de Celia Carlini publicó un trabajo en el cual se reportaba por primera vez la actividad funguistática de Jaburetox (Postal, Martinelli et al. 2012). En el trabajo se describe un protocolo sencillo mediante el cual se observa, al crecer cultivos líquidos de distintas especies de levaduras incubadas en presencia u ausencia de la entomotoxina, que Jaburetox es capaz de inhibir el crecimiento celular de las mismas (medido por turbidimetría a 620 nm). Los resultados del laboratorio de la Dra. Carlini indican que existe una correlación estricta entre la actividad funguistática y la actividad entomotóxica de Jaburetox (Celia Carlini, comunicación personal).

A raíz de estos resultados, pusimos a punto un protocolo en nuestro laboratorio utilizando la proteína producida en *E. coli* (con probada acción funguistática) para ser utilizado luego para evaluar la actividad de las proteínas expresadas por la cepa de *S. cerevisiae* producida en este trabajo.

En la **figura 8** se presenta el resultado obtenido al ensayar la proteína Jaburetox-2Ec obtenida de purificados de la cepa de *S. cerevisiae* optimizada. Como se puede observar, al crecer los cultivos de levadura durante 48 hs en presencia de 6 μM de Jaburetox purificada de *E. coli* o *S. cerevisiae* se logró inhibir el crecimiento celular de manera semejante al antibiótico hygromicina. Por otro lado, se observa una clara turbidez del cultivo celular incubado con el buffer de la proteína (control negativo), pudiéndose concluir que la proteína recombinante purificada presentó una actividad funguistática comparable a la proteína recombinante purificada de *E. coli*.

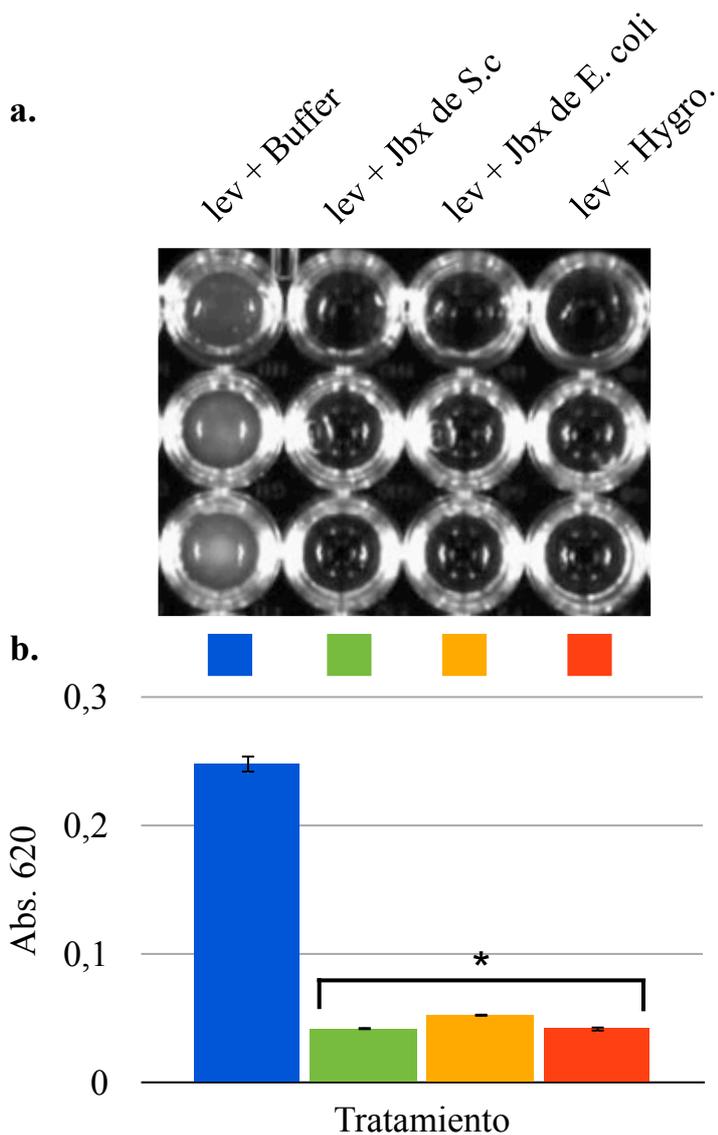


Figura 8. La proteína recombinante purificada de *S. cerevisiae* presentó una actividad funguistática comparable a la proteína recombinante purificada de *E. coli* y al antibiótico hygromicina. Se colocaron 60 μ l de dilución celular en placas de 96 wells con fondo en U incubadas junto con 6 μ M de la proteína purificada de levaduras. Como control positivo se utilizó proteína purificada de *E. coli* en iguales concentraciones e hygromicina. El control negativo se realizó utilizando el buffer de la proteína producto de la última diálisis. Pasadas las 48 hs de incubación a 30 °C sin agitación, el crecimiento celular fue evaluado por turbidimetría a una longitud de onda de 620 nm. **(a)** Foto tomada del ensayo realizado donde se puede apreciar a simple vista la turbidez presente en el control negativo donde se incubaron las células únicamente con buffer a diferencia de los ensayos realizados con la entomotoxina purificada de *S. cerevisiae* y *E. coli*. **(b)** Gráfica realizada con los datos de Abs a 620 nm obtenidos luego de la lectura de la placa para el ensayo realizado sobre células de *S. cerevisiae*.

Resulta sumamente interesante resaltar aquí el hecho de que si bien la entomotoxina no resulta tóxica al ser producida intracelularmente por *S. cerevisiae*, al aplicarla en el medio de cultivo de la levadura en concentraciones pequeñas, ésta es capaz de ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento similar al producido por el antibiótico hygromicina. Esto plantea una pregunta interesante desde el punto de vista del mecanismo de acción de Jaburetox. Al día de hoy, el mecanismo de acción molecular de Jaburetox no está determinado. Inicialmente un trabajo planteó, utilizando un modelado molecular del tipo *ab initio*, que Jaburetox-2Ec presenta un motivo estructural similar al encontrado en una familia de proteínas formadoras de poros de membranas (Balasubramanian and Ponnuraj 2010). Utilizando vesículas unilamelares, como modelo de membranas biológicas, se logró demostrar que efectivamente Jaburetox-2Ec era capaz de interactuar con las mismas promoviendo permeabilización de las membranas (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007). Posteriormente, se intentó determinar qué regiones específicas o residuos aminoácidos son determinantes en la función de Jaburetox-2Ec realizando mutagénesis del tipo sitio-dirigido, pero los resultados no lograron esclarecer este punto (Martinelli, Kappaun et al. 2014).

Con los datos obtenidos hasta el momento, podríamos pensar en diversas razones para explicar por qué la proteína no resulta tóxica para el modelo utilizado al ser expresado intracelularmente pero si ejerce un efecto funguistático al ser aplicado en el medio de cultivo de *S. cerevisiae*. En primer lugar podríamos pensar en la posibilidad de que el blanco de acción de Jaburetox-2Ec se encuentre únicamente en la cara extracelular de las membranas de la levadura. Como bien se sabe, las membranas biológicas son asimétricas, presentando diferentes dominios, moléculas y funciones específicas a uno u otro lado de la misma. Con lo cual se podría explicar por qué el efecto de la entomotoxina se observa únicamente al aplicarla en el medio de cultivo.

Por otro lado, durante este trabajo se observó que al aumentar el pH del medio de cultivo utilizado en los bioensayos de levaduras de 5.5 a 6.5, se logra inhibir la acción funguistática de la proteína (resultados no mostrados). Esto podría constituir una segunda explicación, ya que el pH del citoplasma de levaduras incubadas en los medios de cultivos utilizados es cercano a 7 (Eraso and Gancedo 1987) lo cual supondría un efecto inhibitorio de la actividad de la entomotoxina.

4.1.9 Construcción de cepas de *P. pastoris* productoras de Jaburetox

Como sistema de expresión alternativo a *S. cerevisiae* se eligió *P. pastoris*. Al igual que *S. cerevisiae*, *P. pastoris* es fácilmente manipulable desde el punto de vista genético y la expresión de proteínas heterólogas en este organismo puede llegar a ser de 10 a 100 veces mayor que en *S. cerevisiae* (Cregg, Cereghino et al. 2000). Además con *P. pastoris* se logran alcanzar altas densidades celulares en biorreactores o fermentadores permitiendo un fácil escalado de la producción de proteínas heterólogas, razón que las convierte en atractivas como sistema de producción de proteínas (Porro, Sauer et al. 2005).

Nuestro objetivo fue inicialmente construir un amplio repertorio de condiciones de expresión de Jaburetox-2Ec y -V5 con el fin de encontrar la condición que permita mayores niveles de expresión de proteína soluble, ya que a priori no teníamos datos que nos llevaran a considerar una condición en particular como óptima para obtener mejores rendimientos. Para ello se clonó el gen de Jaburetox-2Ec y -V5 en distintos vectores de expresión para *P. pastoris*. Utilizamos los vectores de la línea pGAPZ y pPICZ de Invitrogen que varían en sus promotores, pudiendo ser estos inducibles por metanol (promotor AOX) o constitutivos (promotor GAP) y que además permiten expresar la proteína intracelularmente o extracelularmente según presenten la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*. Esta línea de vectores es comúnmente utilizada para expresión de proteínas heterólogas en este sistema.

En una segunda etapa, después de adquiridos los genes en GenScript, se decidió generar además construcciones utilizando el gen Jaburetox-2Ec optimizado. Decidimos incluir únicamente la versión 2Ec de la proteína optimizada porque contábamos con información al momento que nos indicaba que la versión -V5, tanto optimizada como sin optimizar, presentaba problemas de expresión y/o solubilidad en *S. cerevisiae* lo cual, debido a las similitudes entre ambos sistemas de expresión, nos dio a pensar que probablemente la versión carente del epítopo V5 presentara también dificultad en *P. pastoris*.

Como método de clonado optamos por RF clonaje (van den Ent and Lowe 2006), por resultar simple y eficiente (ya que no necesita de enzimas de restricción) y contábamos ya con un protocolo en nuestro laboratorio. Para ello los genes de Jaburetox-2Ec y -V5 utilizados fueron amplificados con pares de oligonucleótidos que portan en sus extremos 5' secuencias homólogas a las regiones que preceden y siguen al sitio blanco de los diferentes vectores seleccionados. En la **figura 9.a**, se

muestra un gel de electroforesis donde se analizaron los fragmentos de la PCR resultantes de la amplificación de los genes Jaburetox-2Ec y Jaburetox-V5 sin optimizar para su posterior clonado en el vector pPICZ A por RF clonning. Se observa que se amplificaron dos fragmentos con movilidades electroforéticas distintas. Esto era de esperar ya que el gen de Jaburetox-2Ec contiene 437 pb (92 pb correspondientes al epítipo V5) y el gen de Jaburetox-V5 contiene únicamente 345.

Los genes amplificados, fueron purificados y utilizados como “megacebadores” en una segunda ronda de PCR junto con el vector pPICZ A a clonar. En la **figura 9.b** se observa el gel de agarosa realizado para analizar las reacciones producto del RF clonning. En los carriles 1 y 2, en los cuales se cargaron 9 ul del producto de las reacciones de clonado, se observan claramente un amplificado de entre 3000 y 4000 pb que se corresponde a los vectores en el que el megacebador fue clonado con éxito. Aparte vemos en estos carriles dos bandas de mayor movilidad electroforética; 1) una de aproximadamente 3000 pb correspondiente el vector parental no amplificado, idéntico a la banda observada en el carril 3 donde se cargó el producto del control negativo realizado sin megacebador (conteniendo únicamente el ADN plasmídico) y 2) bandas de tamaño entre 250 y 500 pb, siendo la del carriles 1 levemente mayor que la del carril 2 correspondientes al megacebador no clonado (patrón idéntico al observado al amplificar los megacebadores **figura 9.a**). Habiéndose corroborado la presencia de amplificado que confirma que la reacción de clonado fue exitosa, se procedió a eliminar todo restos de ADN parental digiriendo el producto de la reacción de RF clonning con la enzima DpnI y con el producto de la digestión se transformaron células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. La selección de transformantes se realizó en placas LB-agar con zeocina (concentración final: 25 μ g/ml), y luego se seleccionaron clones y se extrajo el ADN plasmídico para su posterior análisis.

Se confirmó la presencia del inserto por PCR (protocolo de amplificación idéntico al utilizado para la amplificación de los genes de interés) utilizando los mismos oligos que hibridan en las primeras y últimas 25 pb del gen. En la **figura 9.c** se presenta el gel de agarosa realizado para analizar los productos de PCR realizada, previo a la secuenciación de los vectores construidos, para verificar la presencia del inserto. Como se puede observar, se obtuvo un patrón de bandas similar al observado en la **figura 9.a** donde en cada carril se observa una banda de gran intensidad de tamaño de entre 250 y 500 pb, siendo la del carril 1 de mayor tamaño (fragmento correspondiente al amplificado del gen Jaburetox-2Ec) que al observado en el carril 2 (fragmentos correspondientes al amplificado del gen Jaburetox-V5).

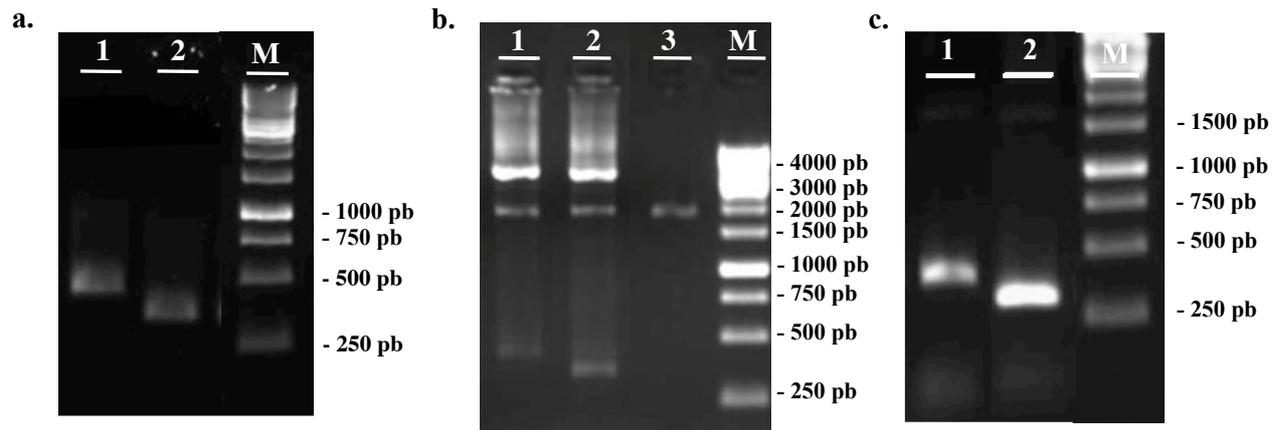


Figura 9. Clonado de las secuencias Jaburetox2Ec y -V5 sin optimizar en el vector de expresión pPICZ A. Corrida electroforética de: **a.1.** Jaburetox-2Ec amplificado con oligo N° 4 y 5 para posterior clonado en el vector pPICZ A. **a.2.** Jaburetox-V5 amplificado con oligo N° 4 y 6 para posterior clonado en el vector pPICZ A. **b.1.** Clonado de la secuencia Jaburetox-2Ec en el vector pPICZ A por RF clonaje. **b.2.** Clonado de la secuencia Jaburetox-V5 en el vector pPICZ A por RF clonaje. **b.3.** Control negativo del clonado realizado con ADN plasmídico sin megacebador. **c.1.** Amplificación de la secuencia Jaburetox2Ec utilizando oligos N° 4 y 5 para confirmar su presencia en el vector pPICZ A clonado. **c.2.** Amplificación de la secuencia Jaburetox-V5 utilizando oligos N° 4 y 6 para confirmar su presencia en el vector pPICZ A clonado. **M.** Marcador de peso molecular.

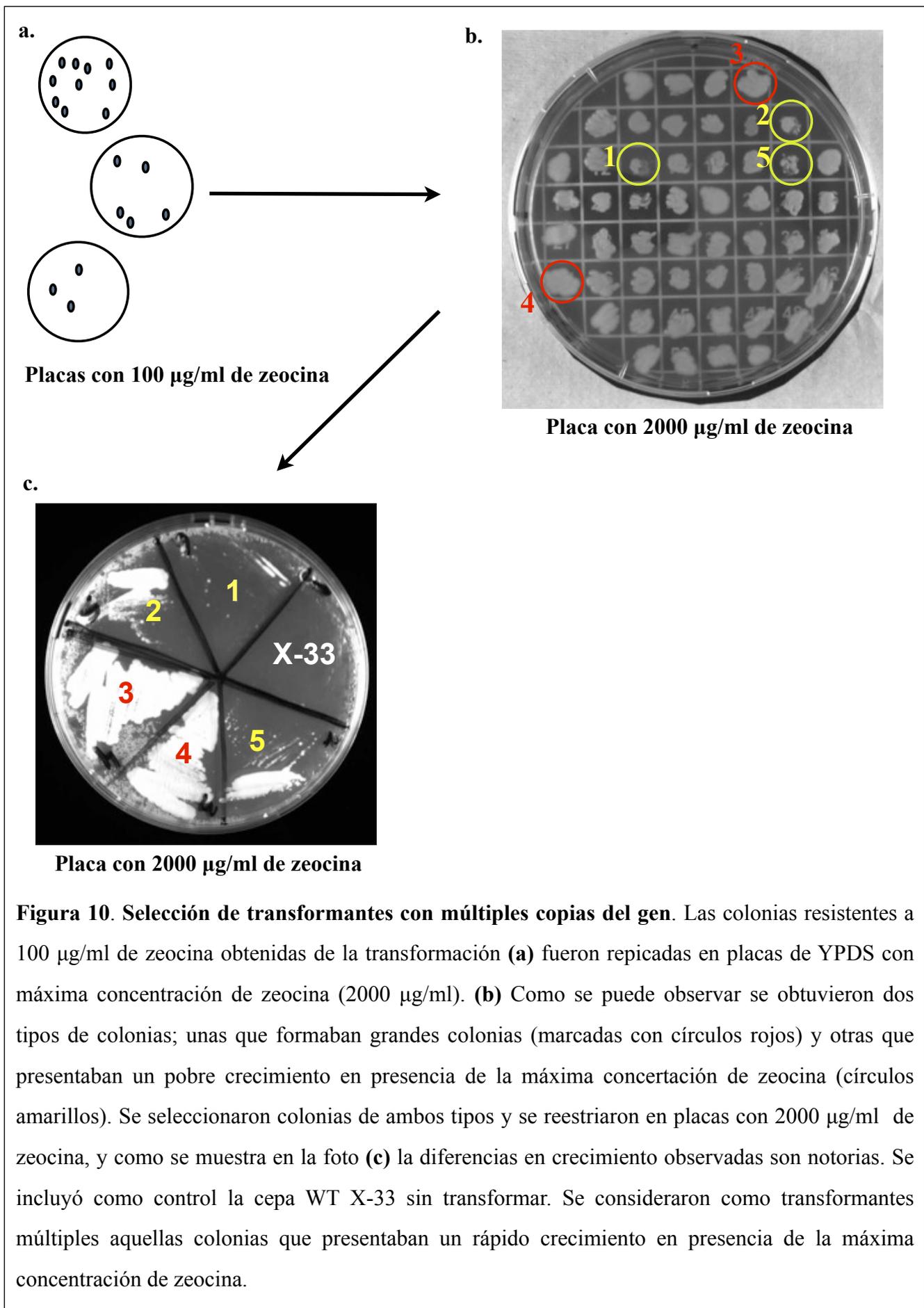
Una vez confirmada la presencia de amplificado de los tamaños esperados, los plásmidos fueron secuenciados. En todos los casos, el análisis de las secuencias confirmó el correcto clonado de los genes de interés (se secuenció el 100% de cada ORF, resultados no mostrados) con lo cual se prosiguió a transformar por electroporación la cepa X-33 de *P. pastoris*. El protocolo utilizado fue idéntico para el resto de los vectores y secuencias.

Los vectores de la línea pGAPZ y pPICZ están diseñados para integrarse en el genoma de *P. pastoris* mediante recombinación homóloga sobre un sólo sitio de homología (manual de usuario, Invitrogen). Debido a esto, se espera que ocurran múltiples inserciones generando clones transformantes con múltiples copias del gen de interés en el cromosoma. El gen *sh ble* de resistencia a zeocina (presente en todos los vectores utilizados) provee de una manera simple de seleccionar transformantes con múltiples inserciones del gen ya que a mayor número de copias del gen las

colonias resisten a mayores concentraciones de zeocina (rango lineal entre 100 y 2000 μg de zeocina por mL de medio).

Las células transformadas por electroporación fueron entonces inicialmente seleccionadas en placas con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zeocina y posteriormente seleccionadas y replaqueadas en concentraciones crecientes de zeocina (hasta 2000 μg de zeocina por mL de medio). Lo que observamos al seleccionar en la máxima concentración de zeocina fue que la selección no era del tipo “todo o nada” sino que había clones que presentaban un crecimiento mayor en menor tiempo, mientras que otros clones apenas lograban multiplicarse. En la **figura 10** se muestra una placa (con máxima concentración de zeocina) en donde se puede observar claramente el patrón descrito; se observan colonias de gran crecimiento (demarcadas en rojo) mientras que se observa presencia de colonias con leve crecimiento (enmarcadas en amarillo). Decidimos entonces seleccionar únicamente los clones que presentaron un rápido crecimiento y procedimos a analizar la expresión de los mismos.

De manera paralela para cada plásmido utilizado, se calculó la eficiencia de transformación de *P. pastoris* utilizando el número de colonias resistentes obtenidas en placas con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zeocina, en función de la cantidad de ADN utilizada en la transformación. La misma resultó aproximadamente $1,1 \times 10^3$ colonias por μg de ADN para los vectores pPICZ A, y 20 colonias por μg de ADN para los vectores pGAPZ A. Los plásmidos que contienen el promotor constitutivo GAP presentaron, en todas las transformaciones realizadas, eficiencias notoriamente menores que los plásmidos con el promotor inducible AOX1. No sabemos si esto se debe a diferencias intrínsecas entre los vectores pPICZ y pGAPZ para obtener transformantes y/o a que la expresión constitutiva de Jaburetox ejerce algún efecto tóxico para la cepa utilizada.



Para el caso de Jaburetox-2Ec optimizada los pasos seguidos fueron similares. A diferencia del caso anterior, decidimos incluir además los vectores pPICZ α A y pGAPZ α A para expresión extracelular de proteína. En todos los casos se obtuvieron resultados similares a los observados para los genes no optimizados (resultados no mostrados). En la **tabla X** se muestran todas las cepas construidas en esta etapa del proyecto.

Tabla X. Cepas de *P. pastoris* construidas en este proyecto

Nº	Parental	Genotipo	Utilidad
1	X-33	pPICZA	Vector vacío, control negativo de expresión
2	X-33	pPICZA-Jaburetox2Ec	Expresión intracelular de Jbx2Ec bajo control de promotor AOX inducible con metanol
3	X-33	pPICZA-Jaburetox-V5	Expresión intracelular de Jbx-V5 bajo control de promotor AOX inducible con metanol
4	X-33	pPICZA-Jaburetox2Ec opt.	Expresión intracelular de Jbx2Ec optimizada bajo control de promotor AOX inducible con metanol
5	X-33	pGAPZA	Vector vacío, control negativo de expresión
6	X-33	pGAPZA-Jaburetox2Ec	Expresión constitutiva e intracelular de Jbx2EC
7	X-33	pGAPZA-Jaburetox-V5	Expresión constitutiva e intracelular de Jbx-V5
8	X-33	pGAPZA-Jaburetox2Ec opt.	Expresión constitutiva e intracelular de Jbx2EC optimizada
9	X-33	pPICZ α A	Vector vacío, control negativo de expresión
10	X-33	pPICZ α A-Jaburetox2Ec opt.	Expresión extracelular de Jbx2EC optimizada bajo control de promotor inducible con metanol
11	X-33	pGAPZ α A	Vector vacío, control negativo de expresión
12	X-33	pGAPZ α A-Jaburetox-V5 opt.	Expresión extracelular de Jbx2EC optimizada bajo control de promotor constitutivo

Podemos concluir que nuestro objetivo inicial de construir un amplio repertorio de condiciones de expresión de las distintas versiones de la proteína Jaburetox fue cumplido con éxito. El análisis de las cepas construidas, para determinar aquellas condiciones que permiten alcanzar un máximo rendimiento de expresión, quedó pospuesto debido a que al momento de iniciar la caracterización surgió un tercer y nuevo objetivo que nos pareció merecía ser incluido en la presente maestría.

Sumado a esto, ya contábamos al momento con construcciones de *S. cerevisiae* caracterizadas y con rendimientos que nos habilitaban a continuar realizando los bioensayos en *A. aegypti* con lo cual decidimos posponer la caracterización de las cepas de *P. pastoris* construidas. Sin embargo, previo a dicha decisión se realizó un *screening* de clones de Jaburetox2Ec y -V5 sin optimizar obtenidos para determinar si los mismos efectivamente expresaban la entomotoxina.

4.1.12 Inducción y análisis de la expresión intracelular de Jaburetox-2Ec y -V5 sin optimizar

Se seleccionaron colonias aisladas de placas con 2000 µg/ml de zeocina de ambos transformantes (Jaburetox-2Ec y -V5 sin optimizar) y se indujo la expresión. Se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos y la expresión de Jaburetox fue analizada por Western blot. Como se observa en la **figura 11**, para los transformantes de pPICZ se observó presencia de proteína a las 48 y 72 hs de inducción en metanol. En cambio para las cepas que expresan constitutivamente Jaburetox-2Ec se observa un pico de expresión a las 24 hs de iniciado el cultivo, observándose luego una disminución notable de los niveles de la proteína. Esto podría deberse a que la expresión de la proteína ejerce algún efecto tóxico al metabolismo de las levaduras o a que pasado ese tiempo se acumula algún metabolito tóxico o se depleta algún elemento necesario para la correcta expresión de la proteína. Posiblemente para sostener una expresión constitutiva contante de Jaburetox se requiera de un cultivo en *fed-batch* de forma de renovar continuamente el medio de cultivo utilizado, eliminando o diluyendo a su vez cualquier metabolito que pueda ser tóxico para las levaduras. Para la construcción -V5 no se muestran los resultados ya que en ninguno de los dos casos (para PICZ y GAPZ) se detectó mediante éste método presencia de entomotoxina.

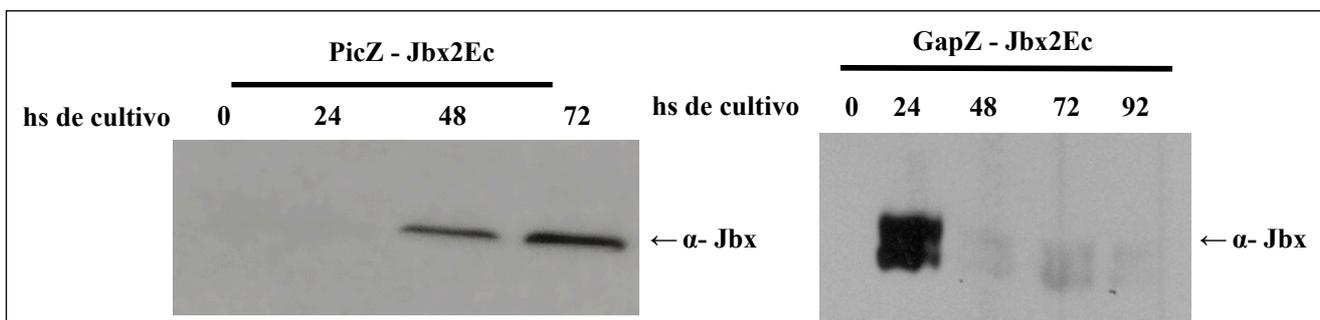


Figura 11. Se detectó la presencia de Jaburetox-2Ec expresada a partir de los vectores PICZ A y GAPZ A a distintos tiempos de inducción. Ensayo de Western blot de extractos de proteínas totales de las cepas construidas. Se incubaron los cultivos con agitación tomándose muestras de cultivos a las horas señaladas. Se cargaron 30 µg de proteína total en cada pocillo y se detectó la presencia de la entomotoxina en las mismas utilizando un anticuerpo policlonal anti-Jaburetox.

Para las cepas analizadas, el nivel de entomotoxina detectado fue sumamente bajo respecto a los valores obtenidos con cepas de *S. cerevisiae* (resultados no mostrados). Esto creemos puede deberse a que no necesariamente la resistencia a altas concentraciones de zeocina correlaciona de manera directa con la productividad del gen heterólogo inserto (Martin Blasco, IIB-INTECH, UNSAM, comunicación personal). Múltiples eventos de recombinación con deleciones en la zona promotora o del gen heterólogo inserto pueden resultar en bajos niveles de expresión manteniendo resistencia a altas concentraciones de antibiótico. Para poder seleccionar cepas de *P. pastoris* con mayor capacidad productiva se deberá rastrear de cientos a miles de transformantes individuales monitoreando los niveles de Jaburetox producida mediante la técnica Dot-blot, ya que la misma permite el multiplexado de manera rápida y más eficiente que la técnica de Western blot.

4.2 Estudio de la acción de Jaburetox y levaduras productoras de Jaburetox en *A. aegypti* y *P. guildinii*.

4.2.1 Bioensayos en *A. aegypti*

El Dengue es una enfermedad viral causante de muerte y enfermedad en humanos siendo el principal vector de este arbovirus el mosquito *A. aegypti*. Hasta el momento no existe vacuna para dicho patógeno, siendo primordial para el control de la enfermedad, el control del insecto vector. Hoy, Uruguay es uno de los pocos países que poseen el vector pero no el virus, siendo este status sanitario el que debemos mantener. Es de gran interés poder determinar si *A. aegypti* es sensible a la proteína insecticida Jaburetox y, de ser así, si las cepas de levaduras productoras de Jaburetox tienen capacidad insecticida sobre este insecto y por lo tanto podrían constituir en un futuro una alternativa atractiva para la producción y entrega de este péptido insecticida a *A. aegypti*.

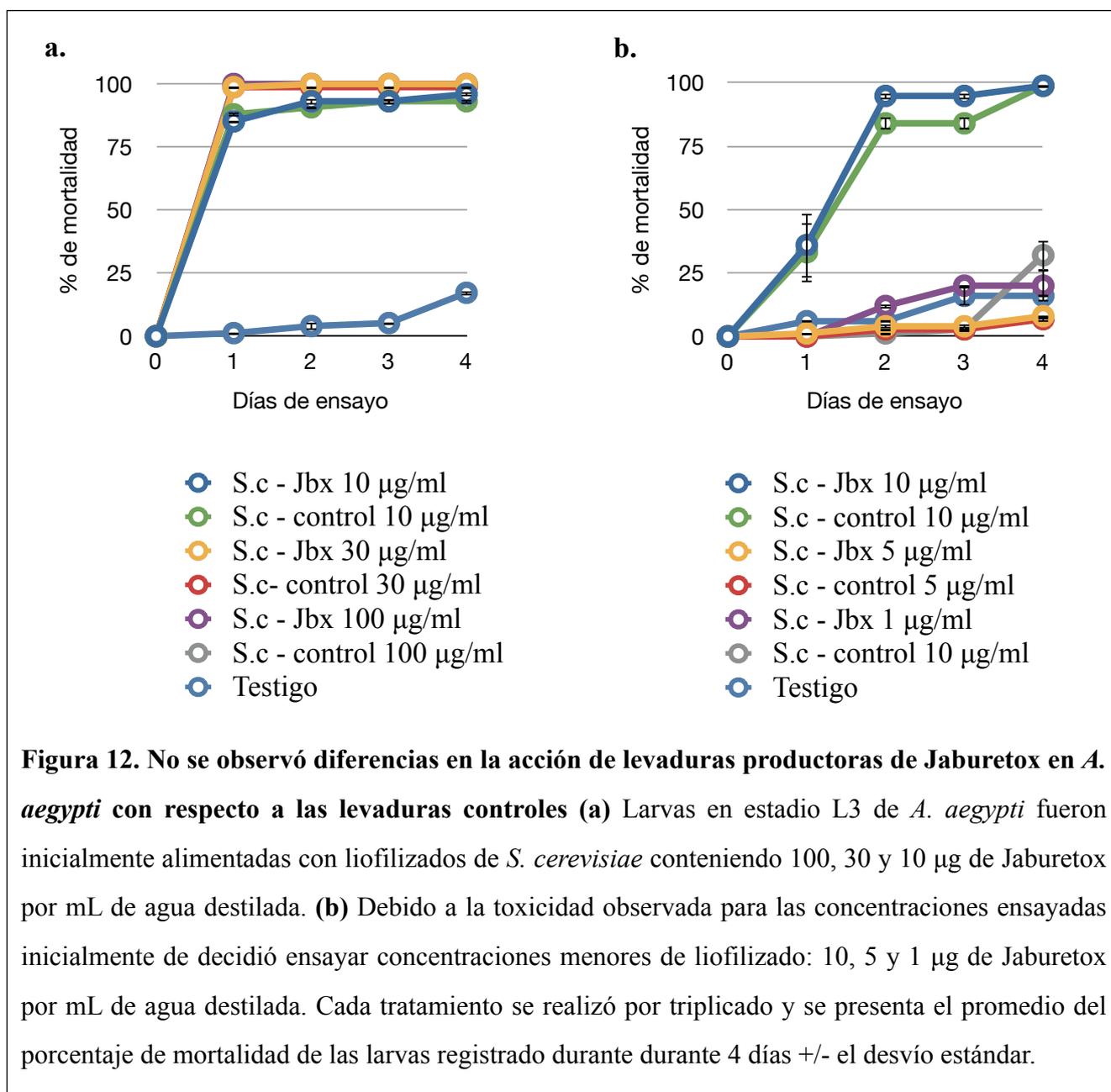
Los ensayos de toxicidad en *A. aegypti* fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Mónica Moreira (laboratorio de Bioquímica de Vectores de Doenças de la Universidad Federal de Río de Janeiro). Los objetivos del ensayo fueron: 1) determinar si *A. aegypti* es sensible a Jaburetox purificado y 2) ensayar la capacidad insecticida de las cepas de *S. cerevisiae* productoras de Jaburetox.

Los tratamientos a ensayar fueron los siguientes; 1) Proteína purificada de *E. coli*, 2) liofilizado de *E. coli* crecidos en condiciones de inducción, 3) liofilizado de *S. cerevisiae* crecidos en condiciones de inducción y 4) testigos a los cuales se los alimentó con ración. Los controles utilizados fueron; 1) el mismo buffer en el que se almacena la proteína, 2) liofilizado de *E. coli* transformados con el vector vacío crecidos en condiciones de inducción 3) liofilizado de *S. cerevisiae* transformados con el vector vacío crecidos en condiciones de inducción.

Para todos los tratamientos se ensayaron inicialmente tres concentraciones: 10, 30 y 100 µg de Jaburetox por mL de agua. Sin embargo, para los liofilizados de *S. cerevisiae* se ensayaron además dos concentraciones menores: 5 y 1 µg de Jaburetox por mL de agua.

En la **figura 12.a**, en el que se muestra el porcentaje de mortalidad en función de los días de transcurrido el ensayo, se puede observar que ya a las 24 hs se registró una mortalidad del 100% para las concentraciones de 100 y 30 µg de Jaburetox por mL de agua. La letalidad en ambas

concentraciones se observa tanto en aquellos individuos tratados con liofilizados conteniendo la entomotoxina como en aquellos tratados con células sin Jaburetox. Para 10 μg de Jaburetox por mL de agua, la mortalidad observada es levemente menor, cercana al 90%, pero al igual que para las concentraciones anteriores no se observan diferencias entre los tratamientos con y sin la presencia de Jaburetox. Los resultados obtenidos en este primer ensayo nos llevaron a pensar que la toxicidad observada no era causada por la entomotoxina sino por las levaduras en sí. Si bien las larvas de *A. aegypti* necesitan de materia orgánica presente en el agua para su alimentación (Aly 1987), para alcanzar las concentraciones ensayadas se necesitó de un gran volumen de liofilizado, el cual podría estar ejerciendo un efecto tóxico *per se* sobre los organismos ya que disminuiría la disponibilidad de oxígeno para su respiración.

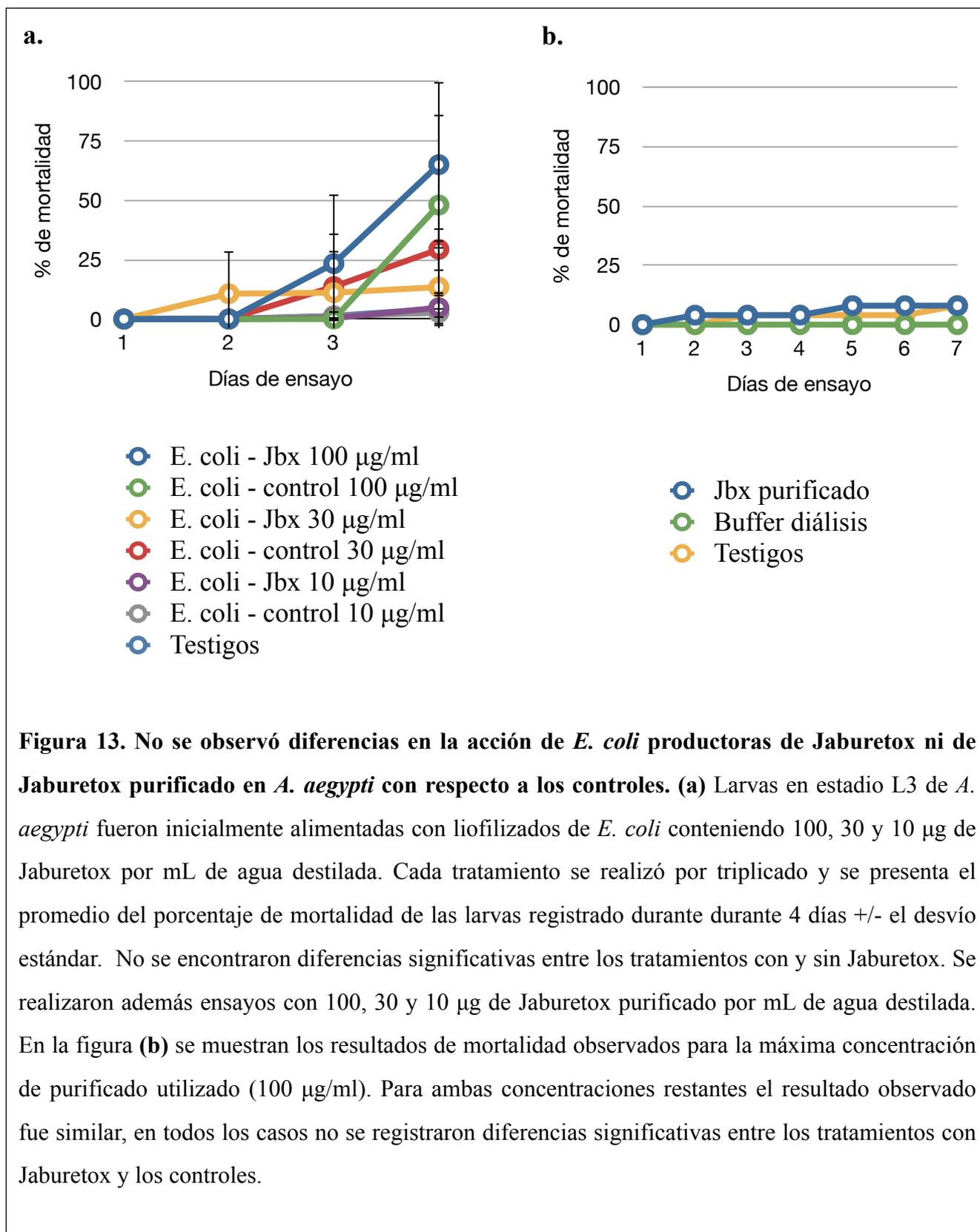


Por esta razón decidimos ensayar concentraciones menores de liofilizado: 10, 5 y 1 μg de Jaburetox por mL de agua destilada. Como se observa en la **figura 12.b** para el tratamiento con 10 μg de Jaburetox por mL de agua se obtuvo un resultado similar al ensayo anterior. Sin embargo, para los tratamientos con 5 y 1 μg de Jaburetox por mL de agua no observamos diferencias significativas entre dichos tratamientos y los testigos o entre los tratamientos con y sin Jaburetox.

Para los ensayos con liofilizados de *E. coli* los resultados obtenidos fueron semejantes a los anteriores; para las concentraciones ensayadas inicialmente no se observaron diferencias significativas entre la mortalidad de las larvas tratadas con y sin la proteína Jaburetox (**figura 13.a**). A diferencia de los ensayos con liofilizados de levadura, para *E. coli* los mg inicialmente utilizados no resultaron tóxicos, probablemente debido a que para alcanzar las concentraciones ensayadas se necesitó de menores cantidades de liofilizados celulares (ya que *E. coli* produce más Jaburetox por unidad de biomasa). De todas maneras, transcurridos los cuatro días de iniciado el ensayo se puede observar que se registró en promedio mayor mortalidad de los individuos tratados con cantidades de liofilizados correspondientes a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de toxina, seguidos de aquellos expuestos a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y por último 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de toxina, lo que nuevamente parecería indicar que existe una relación entre la materia orgánica en solución y la toxicidad observada, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas. En conjunto, los resultados obtenidos con liofilizados de levaduras y bacterias sugerían que las larvas de *A. aegypti* no son sensibles a Jaburetox.

Los ensayos utilizando la proteína purificada de *E. coli* confirmaron esta hipótesis. En estos casos se les ofreció a las larvas como complemento alimenticio; ración al igual que los controles. En la **figura 13.b** se muestra el resultado para 100 μg de Jaburetox por mL de agua, que fue la máxima concentración ensayada. La mortalidad para los individuos crecidos en medio con y sin la proteína fue cercana al 0% y estadísticamente idéntico al comportamiento observado en los controles. Para 30 y 10 μg de Jaburetox por mL de agua los resultados fueron semejantes y a su vez en todos los casos el desarrollo de las larvas no se vio afectado, ya que las mismas lograron empupar y los adultos eclosionaron de igual manera que los individuos no tratados (resultados no mostrados).

En resumen, para todos los ensayos realizados, no se observó susceptibilidad de las larvas L3 de *A. aegypti* a la entomotoxina, al menos no en las concentraciones ensayadas. La respuesta de los insectos (medida en porcentaje de mortalidad) parece ser en todos los casos dependiente de la concentración de materia orgánica presente en el medio e independiente de la presencia o ausencia de Jaburetox.



4.2.2 Bioensayos en *P. guildinii*

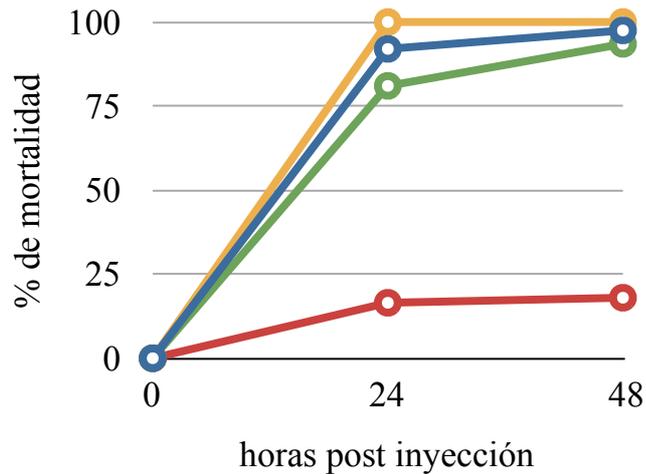
Estos trabajos fueron ejecutados en colaboración con el grupo del Dr. Enrique Castiglioni del laboratorio de Entomología de la Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni (EEMAC), Departamento de Paysandú.

P. guildinii es una especie que presenta grandes dificultades para adaptarse a las condiciones artificiales de laboratorio, ya que principalmente entre el desarrollo de ninfa a adulto un gran porcentaje de los individuos mueren (Gomez, Gaona et al. 2013). Debido a esto recurrimos a la colecta de individuos de campo para los ensayos realizados en esta especie. Por otro lado, al momento de comenzar este trabajo no contábamos con bibliografía previa sobre posibles tratamientos a aplicar para probar la eficacia de una proteína entomotóxica sobre estos insectos, con lo cual se debió previamente poner a punto un protocolo para ensayo de toxicidad.

Primero se intentó administrar la entomotoxina mediante inyecciones en el hemocele, como forma rápida y eficaz de probar toxicidad, siguiendo el protocolo descrito para otros insectos (Simon 2008). Trabajos previos realizados por el grupo de Celia Carlini ya reportaron que al inyectar en la hemocele de *Oncopeltus fasciculatus* y *Rhodnius prolixus* 1.5 µl de buffer conteniendo Jaburetox en concentraciones finales de 0,015 a 0,044 µg respectivamente, se obtienen mortalidades cercanas al 100% en las primeras 48 a 96 hs, mientras que no se registran porcentajes significativos de mortalidad en insectos controles donde se inyecta únicamente el buffer de la proteína (Martinelli, Kappaun et al. 2014). Como para *P. guildinii* este método de administración no había sido aún ensayado debimos en primer lugar determinar la factibilidad del mismo para este insecto.

En la **figura 14** se observan los resultados observados al ensayar inyecciones en diversas partes del cuerpo (protórax, abdomen inferior y placa posterior). Se graficó el porcentaje de mortalidad en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Para las condiciones ensayadas encontramos que este procedimiento generaba porcentajes de mortalidad cercanos al 100%. Estos resultados se repitieron al ensayar en otras partes del cuerpo aunque nos limitáramos simplemente realizar pequeñas inserciones en la cutícula sin administración de buffers.

a.



● Protórax ● Abdomen inf. ● Placa post. ● Testigos

b.



c.

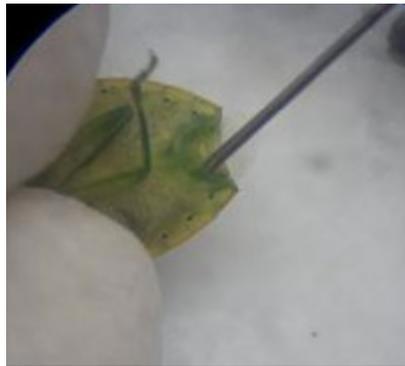


Figura 14. Al realizar inyecciones en la hemocele se obtuvieron porcentajes de mortalidad cercanos al 100%. (a) Se muestran los porcentajes de mortalidad observados luego de aplicada la inyección en protórax, abdomen inferior y placa posterior). Fotografías tomadas al momento de realizar las inyecciones en (b) protórax y (c) placa posterior.

Como alternativa a este método montamos un ensayo en el que se les administró la entomotoxina por vía oral, ofreciéndoles a los individuos colectados, únicamente gotas de la proteína purificada en solución. Para esto se colocaron los insectos en recipientes plásticos únicamente con un disco de papel de mimeógrafo de 2 cm de diámetro embebido en 200 μ l de proteína. Como control se utilizaron individuos a los que, en iguales condiciones, se les ofreció el disco de papel embebido en el mismo buffer de la muestra pero sin proteína. Comprobamos mediante observación directa que los individuos al ser sometidos a ayuno recurren a alimentarse de la mezcla proteica ofrecida

(resultados no mostrados). A su vez, como *P. guildinii* es una especie que muestra grandes dificultades para adaptarse a las condiciones de laboratorio (razón por la cual no se han establecido aún colonias permanentes de laboratorio), incluimos un tercer grupo en el ensayo al que llamamos “testigo” que se mantuvo con alimento y bebida de manera de determinar las muertes naturales ocasionadas por la aclimatación a las condiciones del laboratorio. Cada 12 hs se sustituyeron los discos por nuevos con muestra fresca y se registró la mortalidad de los insectos cada 24 hs durante cinco días.

En la **figura 15** se muestran las curvas de supervivencias obtenidas para los tres tratamientos aplicados, a través de cuatro ensayos independientes. Como se puede ver en la gráfica hasta el segundo día de ensayo, no se observan a simple vista diferencias entre las probabilidades de supervivencia entre los insectos sometidos a los diferentes tratamientos. A partir del segundo día la probabilidad de supervivencia de los insectos tratados con proteína comienza a disminuir de manera más acentuada que para los tratamientos controles. Entre los días cuatro y cinco es donde podemos observar mayores diferencias entre los tres tratamientos, siendo los insectos sometidos al tratamiento con proteína los que presentan menor probabilidad de supervivencia, seguidos de los insectos a los que se les ofreció buffer y por último los testigos. En promedio, al concluir las observaciones, se observó que un 43% de los insectos a los que se les ofreció la muestra proteica seguía con vida, mientras que aproximadamente un 58% de los insectos a los que se trató con buffer sólo y un 82% de los insectos testigos sobrevivieron al ensayo.

Calculamos los riesgos de muerte (RM, que conceptualmente es lo opuesto a la probabilidad de supervivencia), para los insectos sometidos a los diferentes tratamientos y obtuvimos que existen diferencias significativas entre los mismos ($p < 0,001$). Para los insectos tratados con proteína, el riesgo de muerte es 1.66 veces mayor (lo que significaría un 66 % más) que para aquellos tratados con buffer y 2.8 veces mayor que los insectos testigos. A su vez el grupo de insectos tratados con buffer tiene un riesgo de muerte 1.4 veces mayor que el grupo testigo. Esta diferencia sería atribuible al efecto negativo que tiene la falta de alimento sobre la supervivencia de los insectos.

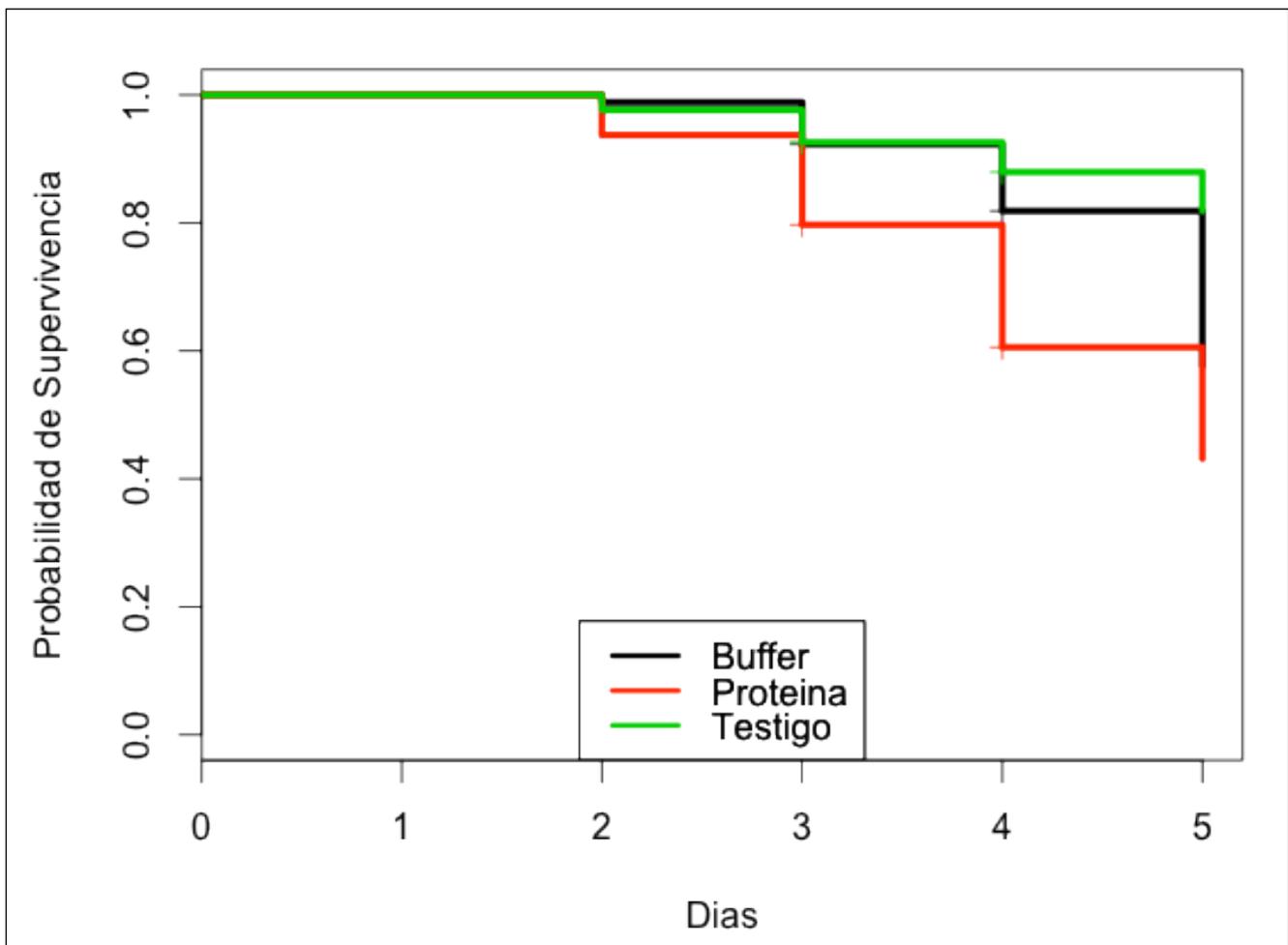


Figura 15. Los adultos de *P. guildinii* a los que se les administró oralmente la entomotoxina Jaburetox presentan una probabilidad de supervivencia significativamente menor a los insectos sometidos a los tratamientos controles. Se utilizaron grupos de entre 30 y 35 insectos para cada tratamiento. Se realizaron cuatro ensayos independientes cada uno con dos o tres repeticiones dependiendo de la disponibilidad de insectos. La mortalidad de los individuos se registró diariamente durante 5 días. Se realizó la curva de supervivencia de Kaplan Meier para los individuos tratados con proteína (rojo), los individuos a los que se les ofreció el buffer de la proteína (negro) y los individuos testigos (verde) a los cuales se les ofreció alimento y fuente de hidratación.

En resumen, durante este trabajo logramos poner a punto exitosamente un protocolo para realizar ensayos de toxicidad en *P. guildinii* mediante administración por vía oral ya sea de Jaburetox o de otro agente a probar. El análisis de los resultados de este ensayo nos permite concluir que existe susceptibilidad de *P. guildinii* a la administración oral de Jaburetox. Consideramos que este resultado es de gran relevancia ya que hasta el momento no se conocen otros tipos de proteínas que

resulten tóxicas a este insecto. *P. guildinii* es un insecto con un aparato bucal del tipo pico suctor que se alimenta de semillas de diversas leguminosas, entre ellas soja y alfalfa (Panizzi 1997). Esto plantea la generación de variedades de cultivos productoras de Jaburetox en estos tejidos embrionarios como alternativas para el control de este insecto. Dichos cultivos pueden luego ser utilizados como plantas trampa, la cual es una estrategia ya utilizada para el control de plagas (Zehnder, Gurr et al. 2007). La utilización de plantas trampa consiste en utilizar un pequeño espacio, en general en los bordes de las plantaciones, dónde se siembran las plantas unas semanas antes que el resto del territorio. Estas plantas florecen antes y atraen a las poblaciones de chinches o incluso se utilizan, en varias ocasiones, cultivos que resulten más atractivos para el insecto que los de interés comercial (Panizzi 1987). La idea de ambas estrategias es la de restringir a las poblaciones de insectos plagas a zonas determinadas dónde después se puede aplicar insecticida de manera controlada, evitando afectar los cultivos comerciales (Shelton and Badenes-Perez 2006). En este caso, las leguminosas que expresen Jaburetox en sus semillas podrían ser utilizadas en estas estrategias evitando o disminuyendo el uso de insecticidas necesario para el control de *P. guildinii*.

En este momento, estamos realizando bioensayos con Jaburetox en lagartas de *Rachiplusia nu* (lepidóptero). Estas lagartas defoliadoras son consideradas en Uruguay plagas de soja y otras leguminosas (de Freitas Bueno, Farhat Pomari et al. 2012). Los ensayos se están realizando de manera similar a la ya reportada para *Spodóptera frugiperda* (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007). Resultados preliminares sugieren que podría existir un efecto tóxico de Jaburetox sobre estas lagartas ya que se observó que los individuos a los que les administró la proteína logran empupar pero no se observa emergencia de adultos.

4.3 Caracterización bioquímica del estado activo de Jaburetox durante las distintas etapas post-purificación y almacenamiento.

Las ureasas presentan diversas actividades biológicas independientes de la actividad catalítica de la enzima, sin embargo, conforme avanza el tiempo de almacenamiento de la enzima se observa una disminución de las actividades de la misma asociada a la formación de precipitados (Follmer, Barcellos et al. 2001). Del mismo modo, estudios previos sugerían que la actividad entomotóxica de Jaburetox también se correlacionaba con la formación de estados oligoméricos específicos de esta proteína (Barros, Stassen et al. 2009, Balasubramanian and Ponnuraj 2010, Balasubramanian, Balaji et al. 2013). En el trabajo de Tesis Doctoral del Lic. Pedro R. Barros del grupo de investigación de la Dra. Carlini, en el que se evalúa la capacidad de Jaburetox-2Ec purificada de permeabilizar liposomas, se reporta que al almacenar las muestras de proteína purificada a 4 °C durante distintos tiempos se observa una pérdida de actividad concomitante con la aparición de agregados (Barros, Stassen et al. 2009). Los agregados obtenidos son resistentes a la desnaturalización térmica o química, pero al aplicarle presión hidrostática se logra revertir un porcentaje de los agregados y restaurar parcialmente la actividad de la proteína (Barros, Stassen et al. 2009). En el mismo trabajo reportan que la adición de DTT a las muestras logra retrasar parcialmente el proceso de agregado, pero no lo inhibe ni revierte, lo cual indicaría que los agregados no son debidos a la oxidación de la proteína. Por otro lado en el trabajo realizado por el grupo de K. Ponnuraj en el que se reporta por primera vez la estructura de la ureasa JBU de *C. ensiformis*, se plantea la hipótesis de que la actividad de Jaburetox-2Ec podría deberse a una posible capacidad de esta proteína de formar barriles- β en las membranas (capacidad presente en otras toxinas con tendencia a formar poros en membranas) (Balasubramanian and Ponnuraj 2010). A su vez en este trabajo se confirma la presencia de un motivo β -hairpin en la proteína, reportado en un trabajo previo en el que se realizó el modelado *ab initio* de Jaburetox (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007). Ambos trabajos plantean la hipótesis que dicho motivo, de carácter anfipático, podría ser el responsable de la capacidad de la proteína de anclarse y formar poros en membranas.

Por otro lado, al comenzar este trabajo se contaba únicamente con un protocolo de purificación y almacenamiento de Jaburetox a 4°C con el que se podía obtener una muestra cuya estabilidad no superaba siete días, ya que a los pocos días se observaba que la proteína tendía a formar precipitados.

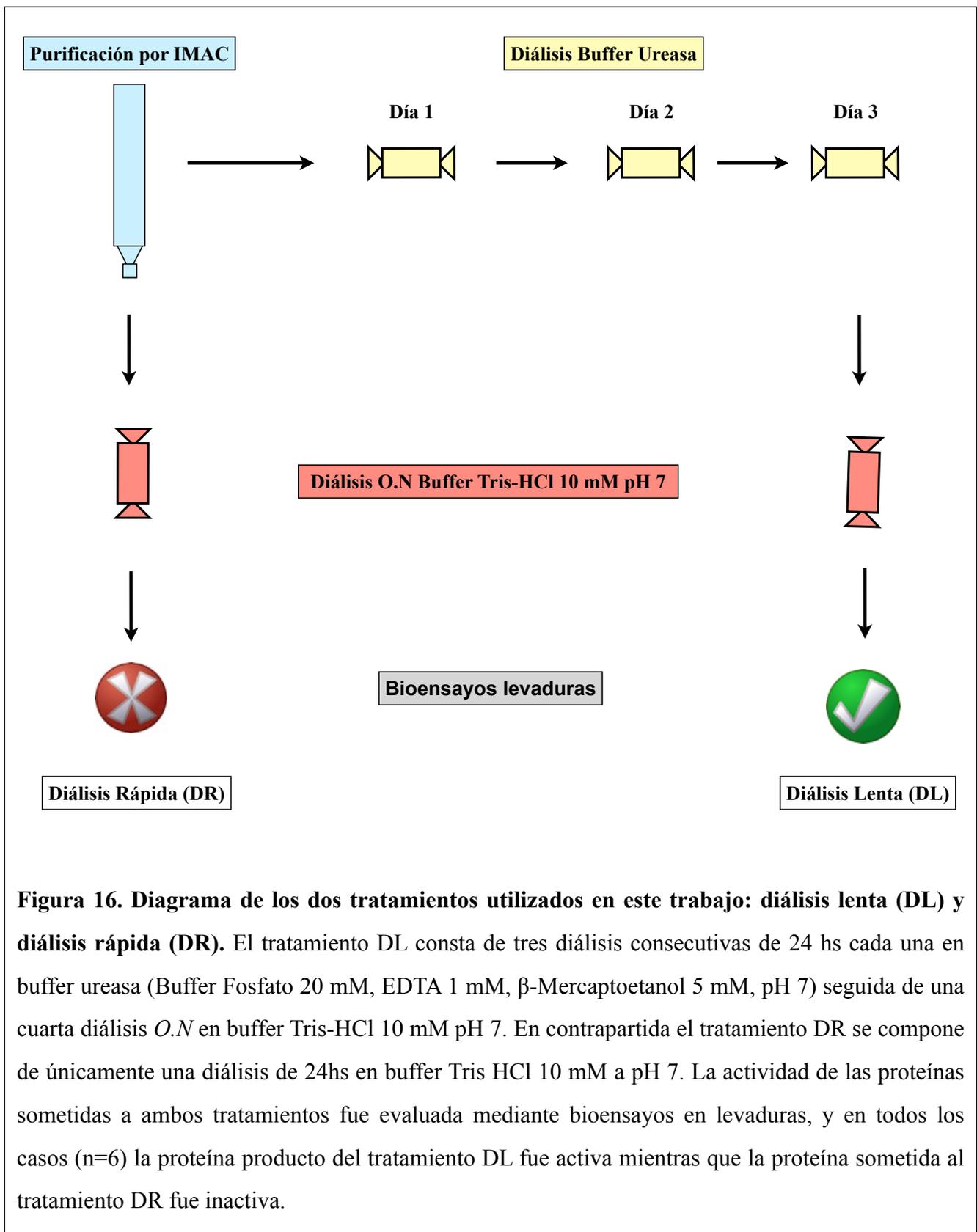


Figura 16. Diagrama de los dos tratamientos utilizados en este trabajo: diálisis lenta (DL) y diálisis rápida (DR). El tratamiento DL consta de tres diálisis consecutivas de 24 hs cada una en buffer ureasa (Buffer Fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -Mercaptoetanol 5 mM, pH 7) seguida de una cuarta diálisis *O.N* en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7. En contrapartida el tratamiento DR se compone de únicamente una diálisis de 24hs en buffer Tris HCl 10 mM a pH 7. La actividad de las proteínas sometidas a ambos tratamientos fue evaluada mediante bioensayos en levaduras, y en todos los casos (n=6) la proteína producto del tratamiento DL fue activa mientras que la proteína sometida al tratamiento DR fue inactiva.

El tratamiento post-purificación que corrientemente se le aplicaba a ambas versiones de Jaburetox (2Ec y -V5) inmediatamente después de ser purificada, consistía en dializar la proteína durante tres días en buffer Ureasa (Buffer Fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -Mercaptoetanol 5 mM, pH 7). Una vez finalizada esta diálisis, la proteína era almacenada a 4 °C para ser utilizada en diferentes ensayos de toxicidad, previo a los cuales se sometía la muestra nuevamente a diálisis en el buffer requerido por el ensayo a ser realizado. Con todo, se requería de no menos de cinco días desde la purificación de la proteína hasta el momento de obtener una muestra pronta para ser utilizada en bioensayos. Nosotros llamamos a este tratamiento “Diálisis Larga” (DL) y observamos que al realizar bioensayos de actividad funguistática con la muestra producida mediante este protocolo obteníamos en última instancia una muestra que invariablemente presentaba actividad (ver **figura 16**). Como se observa en la **figura 17.a** la inhibición del crecimiento celular ejercido por 9 y 18 μ M de la muestra producida mediante el tratamiento DL es estadísticamente similar a la observada para el tratamiento con el antibiótico hygromicina. A su vez el tratamiento con buffer sin proteína no provocó un efecto funguistático sobre las levaduras, registrándose una DO_{620nm} estadísticamente distinta al resto de los tratamientos.

En primera instancia intentamos obtener un protocolo que nos permitiera obtener muestra activa en menor tiempo, por esto decidimos evaluar la actividad de una muestra a la que directamente dializamos en el buffer para realizar los bioensayos (Tris-HCl 10 mM, pH 7), obviando los tres primeros días de diálisis en buffer Ureasa (**figura 16**), protocolo que llamamos en contrapartida “Diálisis Rápida” (DR). Para nuestra sorpresa, la muestra obtenida de esta manera fue en todos los casos inactiva (n=6). Como se puede observar en la **figura 17.b**, para 9 y 18 μ M de la muestra producida mediante el tratamiento DR, el crecimiento celular registrado fue incluso mayor al del tratamiento control con buffer.

Al disponer entonces de dos protocolos mediante los cuales obteníamos sistemáticamente muestra activa e inactiva y basándonos en los trabajos que sugerían que la actividad de la proteína dependía de su estado oligomérico, nos dispusimos a caracterizar las diferencias entre ambas muestras. Nuestro objetivo era determinar y caracterizar el estado oligomérico presente en la muestra DL de manera de luego proceder a estabilizarlo.

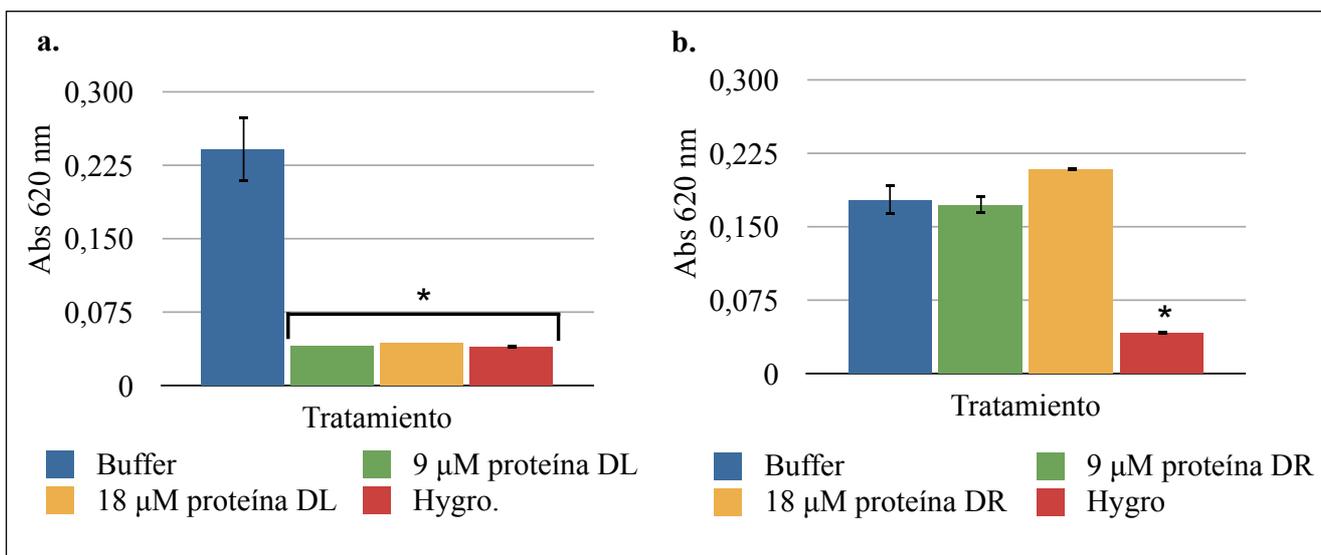


Figura 17. Se detectó actividad funguistática de la proteína producto del tratamiento DL (a) e inactividad de la proteína producto del tratamiento DR (b). La actividad de las proteínas sometidas a ambos tipos de tratamiento fue evaluada mediante bioensayos en *S. cerevisiae*. Se colocaron 60 μl de dilución celular en placas de 96 wells con fondo en U incubadas junto con 9 y 18 μM de proteína producto del tratamiento (a) DL y (b) DR. Como control positivo se utilizó hygromicina y el control negativo se realizó utilizando el buffer de la proteína producto de la última diálisis. Pasadas las 48 hs de incubación, a 30 °C sin agitación, el crecimiento celular fue evaluado por turbidimetría a una longitud de onda de 620 nm. Se graficó la Abs₆₂₀ media obtenida de triplicados +/- el desvío estándar. Se indica con (*) aquellos casos en que se registró una diferencia significativa.

4.3.1 Estudio del grado de oligomerización de Jaburetox

Durante esta etapa se abordó el estudio de los distintos grados de oligomerización alcanzados por Jaburetox-V5, buscando determinar aquellos estados oligoméricos responsables de la actividad de la entomotoxina. En esta parte del proyecto se decidió estudiar únicamente la versión -V5 de la proteína, simplemente porque es ésta la que hoy se utiliza en todos los ensayos y estudios en Brasil. Caracterizamos mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM) dos muestras proteicas: una activa producto del protocolo DL y otra inactiva producto del tratamiento DR, buscando determinar cuál era el estado oligomérico predominante en la muestra activa. Se realizó de esta manera un conjunto de 4 ensayos de inducción individuales, seguidos de distintos protocolos de purificación más caracterización por CEM en el momento de finalizada la purificación y a distintos tiempos de almacenamiento. En la **tabla XI** se muestra un resumen de los resultados de estos

ensayos reportando los estados oligoméricos obtenidos tanto para las muestras DL como DR. Como se puede observar para extractos purificados siguiendo el protocolo DL (todos activos) se identificaron tres estados oligoméricos predominantes (5, 11 y 12n). Para las muestras producto del tratamiento DR (todas inactivas) tampoco se identificó un sólo estado oligomérico, aunque a diferencia del primer tratamiento se observaron más de un estado por muestra.

Algo interesante a resaltar es que (tomando la misma muestra purificada el 16/09 como ejemplo) vemos que al aplicarle a una misma muestra proteica ambos tratamientos en paralelo se obtuvo un mismo estado oligomérico predominante (12n), pero de todas maneras el producto del tratamiento DL fue, como en casos anteriores, activo mientras que el producto del tratamiento DR fue inactivo. Otra observación que nos llamó la atención es que al almacenar las muestras DL por 5 días a 4 °C en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7, las mismas podían mudar o no su estado oligomérico, pero en todos los casos la actividad se conservaba.

Tabla XI. Resumen de estados oligoméricos obtenidos mediante CEM

Purificación	Tratamiento	Estado oligomérico (n)	Toxicidad de levaduras
05/08	DL	11n	Si
12/08	DL	5n	Si
16/09	DL	12n	Si
05/08	DL + 5 días de almacenamiento a 4 °C	6n	Si
12/08	DL + 5 días de almacenamiento a 4 °C	13n + 25n + Xn (fuera del límite de la columna)	Si
16/09	DL + 5 días de almacenamiento a 4 °C	12n	Si
15/04	DR	2n + 3n	No
12/08	DR	6n + Xn (fuera del límite de la columna)	No
16/09	DR	21n + 12n	No

De manera paralela analizamos las muestras DL y DR mediante SDS-PAGE con agregado de ditioneitol (DTT) de manera de determinar si los agregados observados se debían a la presencia de enlaces disulfuro entre monómeros de la proteína. Jaburetox contiene tres residuos de cisteína que podrían estar formando enlaces disulfuro influyendo en la formación de agregados. Tanto para la muestra DR como para la muestra DL tratados con reductor se observaron dos bandas

correspondientes al dímero y al monómero de la proteína, mientras que en ausencia de DTT se observaron especies mayores al dímero (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que la formación de puentes disulfuro puede contribuir a la estabilización de distintos estados oligoméricos. Experimentos de CEM en presencia de distintas concentraciones de agentes reductores podrían ayudar a dilucidar este punto. La existencia de dímeros resistentes a la presencia de DTT sugiere que existe otro tipo de unión presente contribuyendo a la formación y estabilización del estado dimérico, como pueden ser uniones hidrofóbicas o iónicas. Alternativamente, el dímero podría estar formado por enlaces disulfuro que se encuentran inaccesibles al reductor DTT. Como sabemos que Jaburetox contiene al menos una región anfipática (Balasubramanian, Balaji et al. 2013), estamos inclinados a pensar que son las uniones hidrofóbicas posiblemente las que contribuyan a la dimerización de la proteína. Esto podríamos probarlo realizando CEM en presencia de reductor y de manera paralela en presencia de reductor y alta concentración salina, NaCl 1M por ejemplo. Si en el primer caso obtenemos mayoritariamente dímero y en el segundo caso (con presencia de NaCl y reductor) observamos Jaburetox en su estado monomérico podríamos concluir que son las uniones hidrofóbicas las responsables de la dimerización de Jaburetox.

En resumen, los resultados obtenidos hasta ahora a través de la caracterización de Jaburetox por CEM y bioensayos indican que la actividad de esta proteína no está directamente relacionada a un estado oligomérico específico.

4.3.2 Tratamientos post-purificación

De manera paralela se sometió la proteína a distintos tratamientos post-purificación (composición de buffers, duración de la diálisis, tiempo de almacenamiento, etc) de manera de determinar aquellas condiciones esenciales para la obtención y preservación del estado activo de Jaburetox. Dicha precisión no sólo aportaría al elucidado de su mecanismo de acción sino que sería fundamental para desarrollar un protocolo de purificación simplificado que proporcione de manera sistemática proteína activa.

Como se dijo anteriormente mediante ensayos de actividad funguistática advertimos que invariablemente obteníamos proteína activa utilizando el protocolo DL mientras que si no dializábamos la proteína en buffer ureasa y continuábamos, después de la purificación, directamente a dializar 20-24 hs en buffer Tris-HCL 10 mM obteníamos en contrapartida invariablemente

proteína inactiva. Este hecho nos indicaba que necesariamente la proteína necesitaba de la diálisis en buffer ureasa para madurar a su estado activo y nos planteamos entonces determinar la duración necesaria de esta diálisis para el proceso de maduración de Jaburetox-V5. Con este fin, ensayamos tres protocolos distintos: el primero con 24 hs de diálisis en buffer ureasa, el segundo con 48 hs y el tercero con 72 hs y luego con las muestras obtenidas realizamos nuevamente ensayos de actividad funguistática. Como se muestra en la **figura 18** observamos que en todos los casos se obtuvieron muestras activas, pudiendo concluir que las primeras 20-24 hs en buffer ureasa son suficientes para alcanzar el estado activo de la proteína.

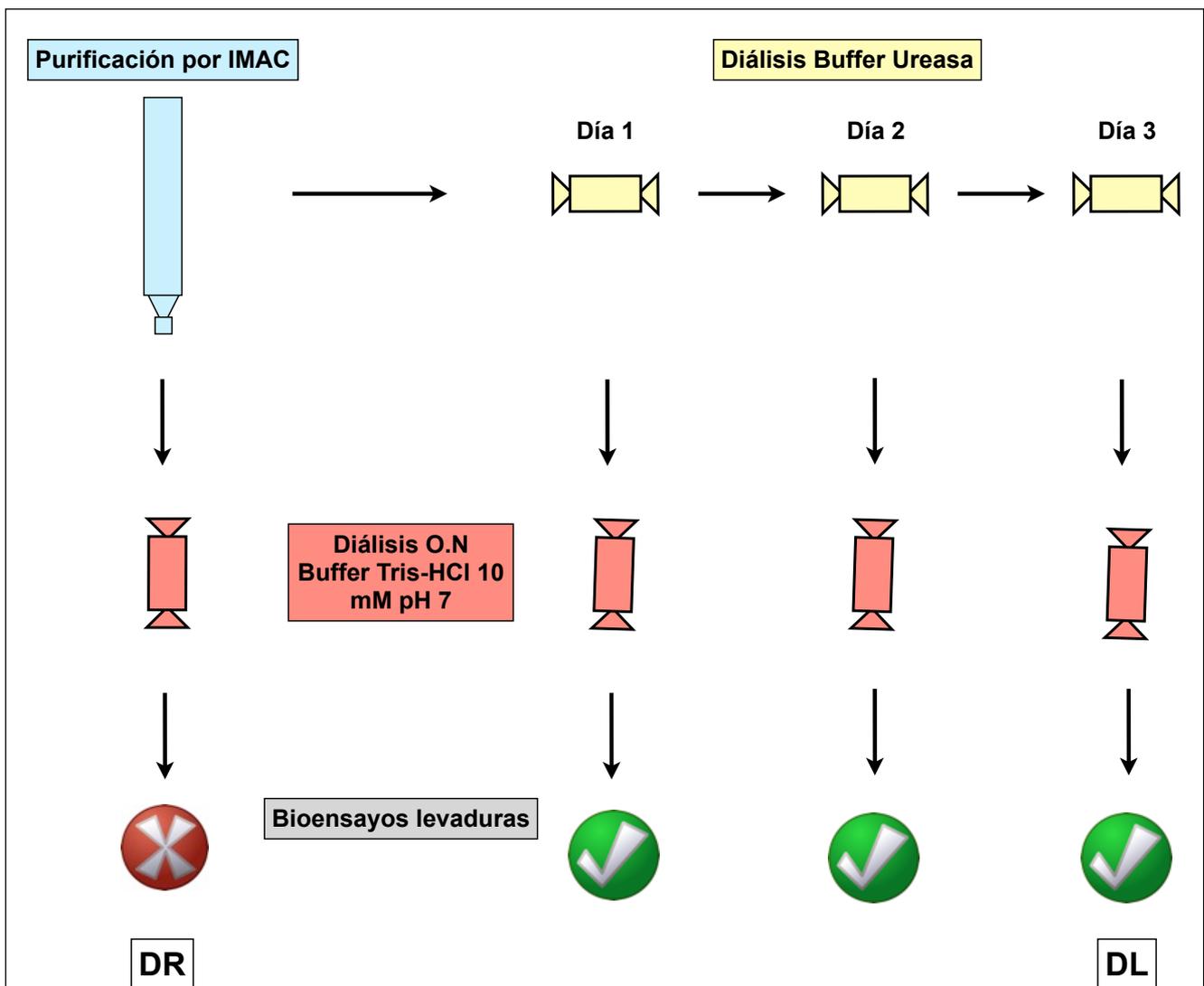
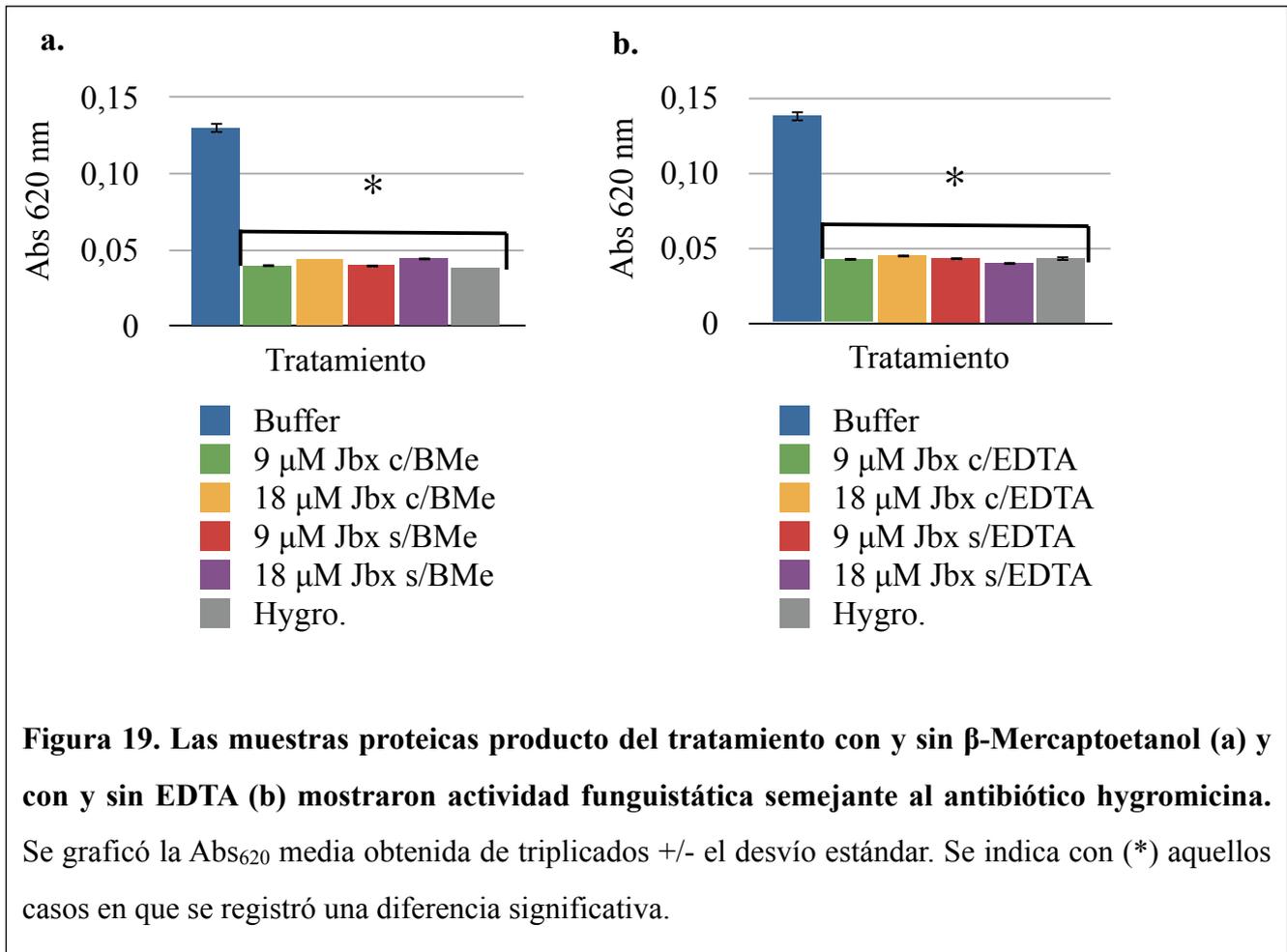


Figura 18. Diagrama de los tres protocolos ensayados con distintas duraciones de diálisis en buffer ureasa. Ensayamos tres protocolos distintos: el primero con 20-24 hs de diálisis en buffer ureasa, el segundo con 48 hs y el tercero con 72 hs. La actividad de las proteínas sometidas a los distintos tratamientos fue evaluada mediante bioensayos en levaduras, y en todos los casos la proteína obtenida fue activa.

Seguidamente nos propusimos determinar qué compuestos de dicho buffer eran determinantes en la maduración de Jaburetox-V5 y medimos la actividad de las muestras obtenidas al remover el EDTA o β -Mercaptoetanol del buffer. Contrariamente a lo que se creía hasta el momento, se halló que tanto el β -Mercaptoetanol como el EDTA no son esenciales para la activación del péptido (ver **figura 19.a** y **19.b**).



A su vez, al determinar que ninguno de los dos compuestos eran esenciales para la activación de Jaburetox, ensayamos la diálisis en buffer fosfato 10mM sin el adiconado de EDTA ni β -Mercaptoetanol, y obtuvimos en todos los casos (n=2) muestras no activas (ver **figura 20.a**). Este resultado indica que para la maduración de Jaburetox a su estado activo es necesaria la presencia de EDTA o de β -Mercaptoetanol. Analizamos la muestras inactivas por Western blot, junto con una muestra dializada en presencia de EDTA y β -Mercaptoetanol como control de proteína activa. Para la muestra activa detectamos, tanto en presencia o ausencia de reductor, señales que se corresponden al estado monomérico y dimérico de Jaburetox, mientras que para la muestra inactiva observamos presencia de agregados y ausencia de monómero en ausencia de DTT (ver **figura 20.b**).

Estos resultados sugieren que, a diferencia de su forma activa, Jaburetox inactiva forma estados diméricos y/o de mayor estado de agregación que son dependientes de la formación de puentes disulfuro. La presencia de β -Mercaptoetanol en el buffer de diálisis podría estar manteniendo un estado reducido de la proteína que previene la formación de estados diméricos u oligoméricos inactivos. Lo que no quedaría del todo claro es por qué la presencia de EDTA sin β -Mercaptoetanol también estaría cumpliendo el mismo rol. Una posible explicación podría ser el papel del EDTA quelante del níquel. Dado que el níquel es en naturaleza oxidativo y que parte del mismo se desprende de las columnas durante la purificación de proteínas marcadas con colas de Histidina, Jaburetox podría ser mantenida en un estado oxidado debido a la presencia de este metal en las muestras. Con lo cual la presencia de EDTA, al secuestrar el metal oxidante, estaría indirectamente contribuyendo a mantener el estado reducido de la proteína al igual que la presencia de β -Mercaptoetanol. Con todo, podemos concluir que el buffer de diálisis debe entonces contener EDTA o β -Mercaptoetanol para obtener el estado activo de Jaburetox, pero no es necesario que estén ambos presentes para ello.

De manera paralela, como se detalló previamente, observamos que al almacenar las muestras activas en buffer Tris-HCl 10mM pH 7 por cinco días la actividad se conservaba. Hasta el momento las muestras se almacenaban en buffer ureasa, con lo cual se lograba conservar la actividad como máximo una semana, pasado el tiempo el cual se registraban precipitados proteicos y pérdida concomitante de actividad. Por eso decidimos continuar monitoreando, mediante ensayos de actividad funguistática, la actividad de las muestras conservadas en buffer Tris-HCl 10mM pH 7 a 4 °C y observamos que la actividad de Jaburetox se conservaba entre diez y doce semanas (resultados no mostrados), superando largamente protocolo existente.

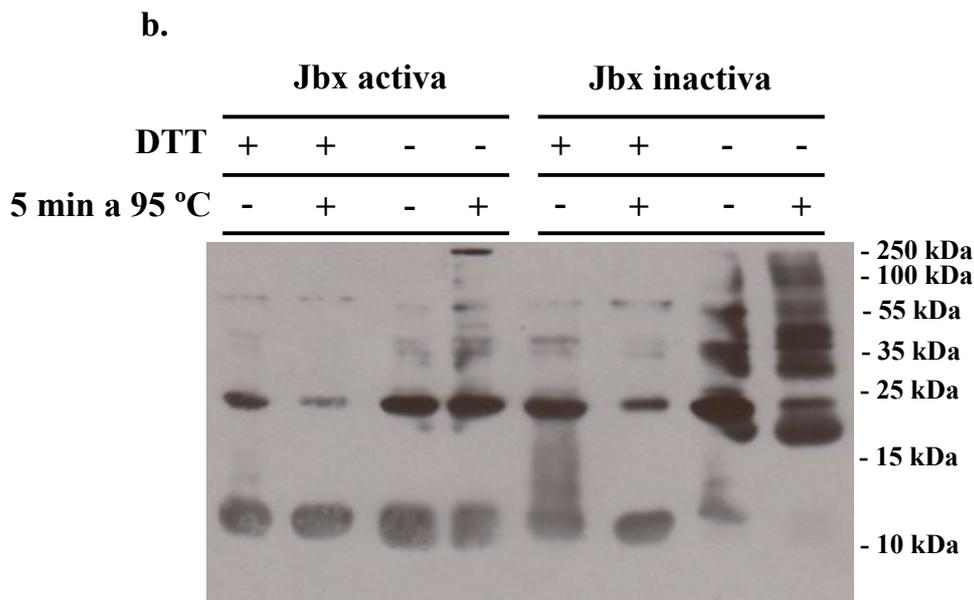
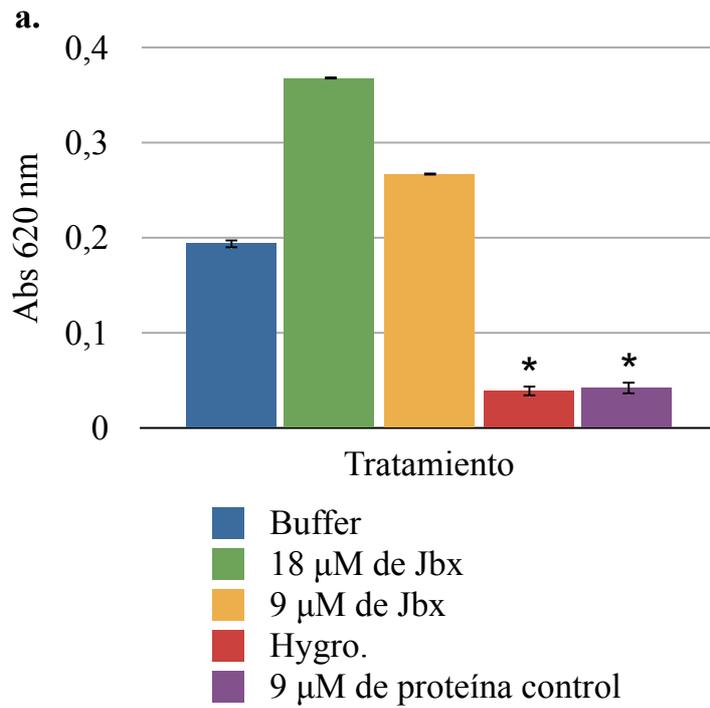


Figura 20. Las muestras proteicas producto de la diálisis en ausencia de EDTA y β -Mercaptoetanol no presentaron actividad funguistática. (a) Se ensayó la actividad funguistática de 18 y 9 μ M de proteína producto de la diálisis en ausencia de EDTA y β -Mercaptoetanol. Como control se incluyó el tratamiento con 9 μ M de proteína dialisada en presencia de ambos compuestos y el tratamiento con el antibiótico hygromocina. Se graficó la Abs₆₂₀ media obtenida de triplicados \pm el desvío estándar. Se indica con (*) aquellos casos en que se registró una diferencia significativa. **(b)** Se detectó la diferencia entre los estados de oxidación de ambas muestras mediante ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal α -Jaburetox. Se cargaron en cada pocillo 30 μ g de proteína total de muestra con o sin actividad funguistática (activa e inactiva respectivamente).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo nos propusimos avanzar en el estudio de alternativas para el control de plagas regionales menos agresivas para el medio ambiente que las actuales empleadas. En este proyecto se propuso generar nuevas alternativas para el control de *P. guildinii* y *A. aegypti* utilizando la proteína insecticida Jaburetox purificada y en paralelo, desarrollando cepas de levaduras que, mediante la expresión de la entomotoxina, puedan servir como ACBs.

En principio generamos transformantes de *S. cerevisiae* productores de Jaburetox recombinante. Determinamos que Jaburetox-2Ec recodificada para la óptima expresión en levaduras se expresa mayoritariamente de manera soluble, alcanzado niveles de 8.4 ± 1 ng por μg de proteína total a las 8 hs de inducción en medio con 2% de galactosa. A su vez, comprobamos que la actividad de la entomotoxina producida es comparable a la actividad de la proteína recombinante producida en *E. coli*. Como perspectivas, creemos que es de vital importancia ensayar la toxicidad de las cepas producidas en insectos modelo, de manera de determinar si las mismas servirán en un futuro como ACB. Un modelo que se ajusta a los requerimientos necesarios para su ensayo, sería *S. frugiperda*. Estas lagartas defoliadoras de cultivos de maíz servirán de modelo ya que existen protocolos de laboratorio que habilitan el trabajo con las levaduras como forma de alimento combinándolas con alimento artificial sólido. Contamos al momento con una colaboración con la Dra. Lúcia Bertholdo-Vargas del instituto de biotecnología de la Universidad de Caxías do Sul (RS, Brasil) en el cual se trabaja rutinariamente con este modelo de insecto y donde ya han ensayado la sensibilidad de esta especie a Jaburetox-2Ec purificado (Mulinari, Staniscuaski et al. 2007) y otros organismos con potencialidad como ACB.

Como sistema de expresión alternativo a *S. cerevisiae* construimos un amplio repertorio de condiciones de expresión de Jaburetox en *P. pastoris*. Clonamos las diferentes construcciones de Jaburetox en distintos vectores de expresión para *P. pastoris* que permiten expresar la proteína intra o extracelularmente según presenten la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae* y que además varían en sus promotores, pudiendo ser estos inducibles por metanol o constitutivos. El análisis completo de las cepas construidas quedó pospuesto debido a que al momento de iniciar la caracterización surgió un tercer y nuevo objetivo que nos pareció merecía ser incluido en la presente maestría. Sin embargo, constatamos que las cepas construídas expresan la entomotoxina, aunque en niveles inferiores a *S. cerevisiae*. Como *P. pastoris* logra alcanzar altas densidades

celulares en biorreactores o fermentadores permitiendo un fácil escalado de la producción de proteínas heterólogas, y a su vez secreta proteínas heterólogas con alta eficiencia (simplificando los procesos de purificación proteica que suelen ser trabajosos y costosos) creemos que esta especie es sumamente atractiva como modelo de producción de Jaburetox. Como perspectivas nos resulta interesante caracterizar las cepas producidas y optimizar la producción de Jaburetox en este modelo.

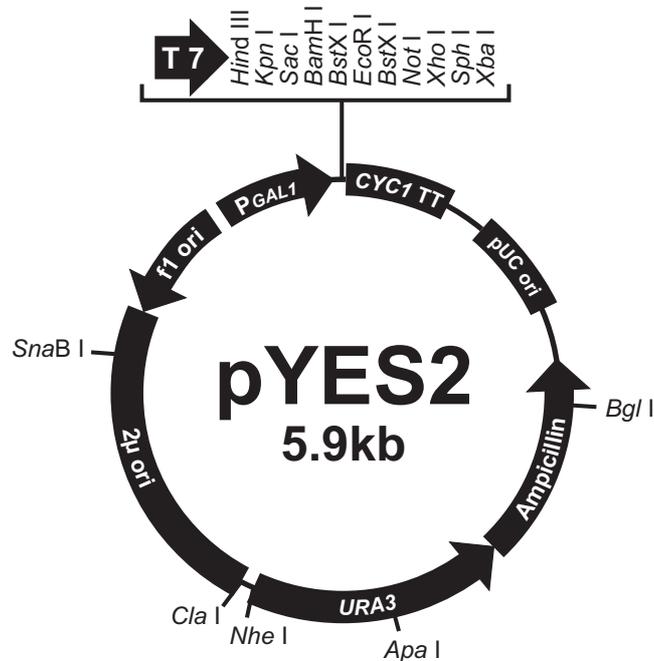
En una segunda etapa, estudiamos la acción de Jaburetox y *S. cerevisiae* productoras de Jaburetox en *A. aegypti*. Los resultados de estos ensayos nos indican que estos insectos no son sensibles a la administración oral de dicha entomotoxina. A su vez, ensayamos la toxicidad de Jaburetox purificada en *P. guildinii*. Para ello pusimos a punto un protocolo de ensayo en dichos insectos, que servirá en un futuro para ensayar otros agentes tóxicos. Mediante este ensayo, logramos administrar la entomotoxina de manera oral a insectos adultos y los resultados demuestran que dicha especie es susceptible a Jaburetox, ya que observamos que los individuos tratados con dicha proteína presentaban en promedio 66% más de riesgo de muerte que los individuos controles a los que les administramos únicamente el buffer de la proteína. Ya que hasta el momento no se conocen otros tipos de proteínas que resulten tóxicas a *P. guildinii* consideramos que este resultado abre la puerta para el desarrollo de métodos de control de esta plaga utilizando Jaburetox.

Como tercer objetivo nos propusimos contribuir a la caracterización bioquímica del estado activo de Jaburetox en las distintas etapas post-purificación. Para ello estudiamos una muestra proteica activa y una inactiva mediante CEM buscando determinar cuál era el estado oligomérico responsable de la actividad entomotóxica. En resumen los resultados obtenidos indican, contrariamente a lo que se creía hasta el momento, que la actividad de esta proteína no está directamente relacionada a un estado oligomérico específico. A su vez, logramos reducir el protocolo existente para la producción de Jaburetox activa, de cinco a tres días y determinamos un buffer de almacenamiento de la proteína que permite conservar su actividad entre diez y doce semanas, superando largamente el protocolo existente que lograba conservar la proteína únicamente por cinco días. Creemos que la caracterización realizada en este trabajo no sólo contribuye a dilucidar su mecanismo de acción sino que será fundamental en un futuro para determinar las condiciones ideales de producción y almacenamiento de Jaburetox.

6. ANEXOS

6.1 Anexo I

Esquema del vector PYES2 (tomado de www.invitrogen.com).

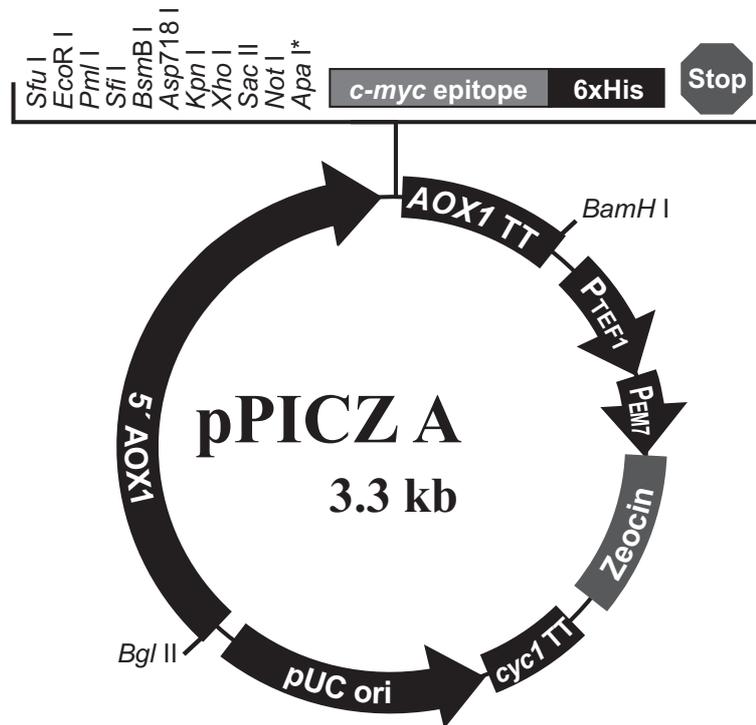


Descripción de los principales elementos del vector.

- Promotor GAL1 que permite la expresión inducible por galactosa.
- Origen de replicación pUC de alto número de copias en *E. coli*.
- Gen de resistencia a ampicilina para selección de transformantes en *E. coli*.
- Gen *URA3* para selección de levaduras transformantes en medio sin agregado de uracilo.
- Origen de replicación de 2 micrones (μ) de alto número de copias en levaduras.

6.2 Anexo II

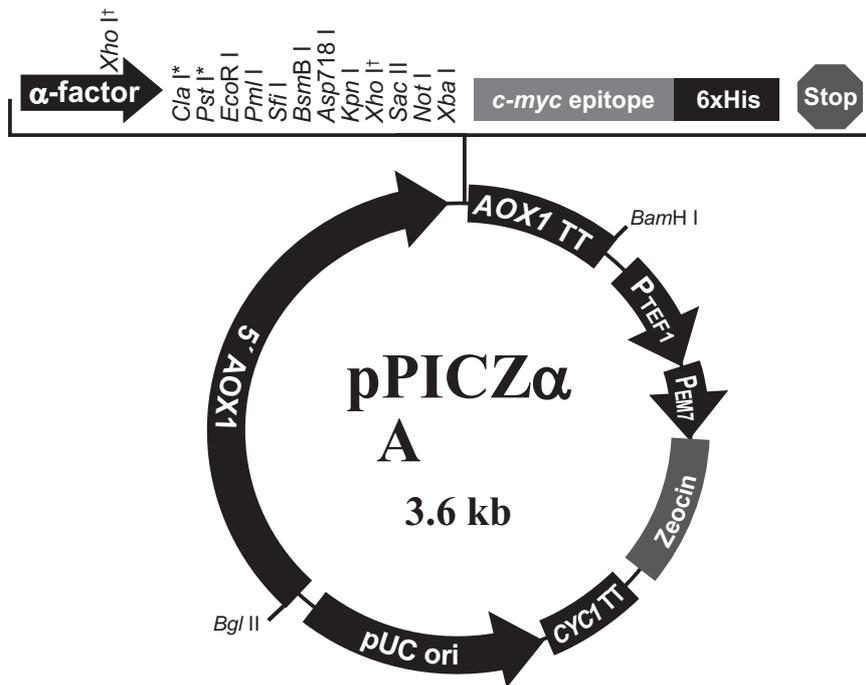
Esquema del vector pPICZ A (tomado de www.invitrogen.com).



Descripción de los principales elementos del vector.

- Promotor *AOX1* que permite la expresión inducible por metanol y a su vez dirige la integración del plásmido en el locus *AOX1* del genoma de *P. pastoris*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *AOX1*.
- Promotor *TEF1* que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *P. pastoris*.
- Promotor EM7 que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *E. coli*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *CYC1* que permite el procesamiento eficiente del gen *Sh ble*.
- Origen de replicación pUC de alto número de copias en *E. coli*.

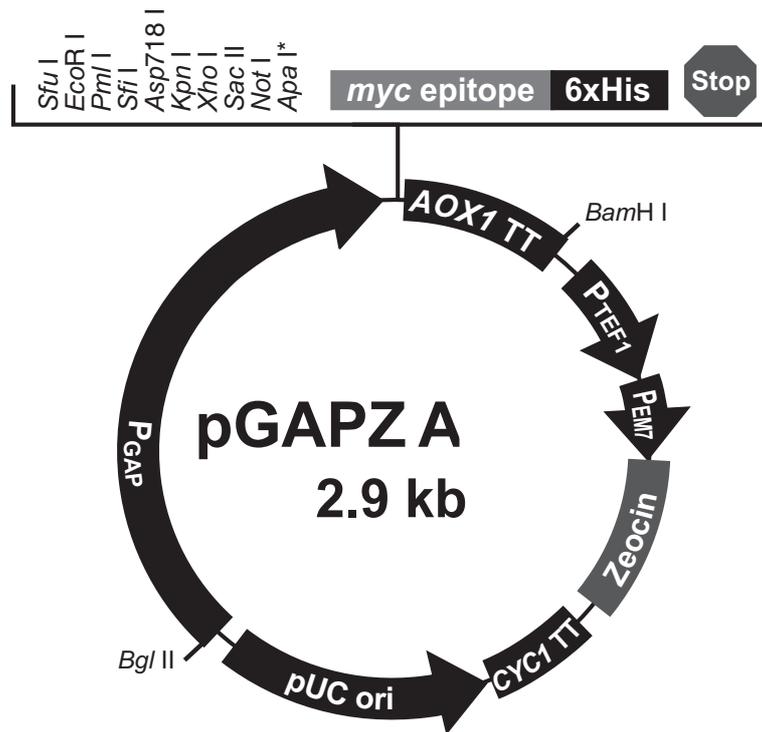
Esquema del vector pPICZ α A (tomado de www.invitrogen.com).



Descripción de los principales elementos del vector.

- Promotor *AOX1* que permite la expresión inducible por metanol y a su vez dirige la integración del plásmido en el locus *AOX1* del genoma de *P. pastoris*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *AOX1*.
- Señal de secreción extracelular del factor α de *S. cerevisiae*.
- Promotor *TEF1* que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *P. pastoris*.
- Promotor EM7 que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *E. coli*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *CYC1* que permite el procesamiento eficiente del gen *Sh ble*.
- Origen de replicación pUC de alto número de copias en *E. coli*.

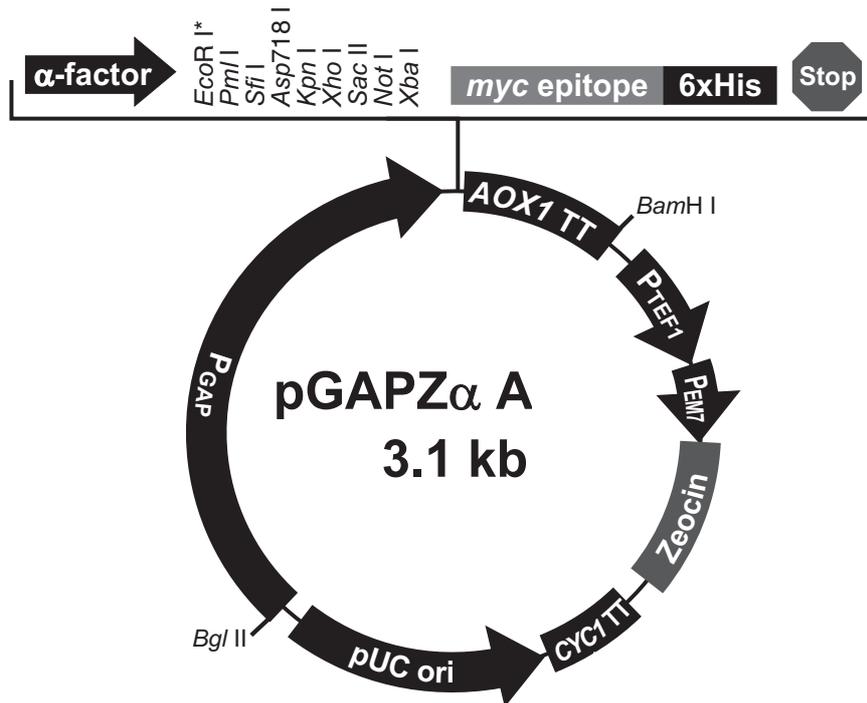
Esquema del vector pGAPZ A (tomado de www.invitrogen.com).



Descripción de los principales elementos del vector.

- Promotor *pGAP* que permite la expresión constitutiva y a su vez dirige la integración del plásmido en el locus GAP del genoma de *P. pastoris*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *AOX1*.
- Promotor *TEF1* que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *P. pastoris*.
- Promotor EM7 que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *E. coli*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *CYC1* que permite el procesamiento eficiente del gen *Sh ble*.
- Origen de replicación pUC de alto número de copias en *E. coli*.

Esquema del vector pGAPZ α A (tomado de www.invitrogen.com).



Descripción de los principales elementos del vector.

- Promotor *pGAP* que permite la expresión constitutiva y a su vez dirige la integración del plásmido en el locus GAP del genoma de *P. pastoris*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *AOX1*.
- Señal de secreción extracelular del factor α de *S. cerevisiae*.
- Promotor *TEF1* que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *P. pastoris*.
- Promotor EM7 que promueve la expresión constitutiva del gen *Sh ble* que confiere resistencia a zeocina en *E. coli*.
- Terminador de la transcripción (TT) del gen *CYC1* que permite el procesamiento eficiente del gen *Sh ble*.
- Origen de replicación pUC de alto número de copias en *E. coli*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akada, R., K. Matsuo, K. Aritomi and Y. Nishizawa (1999). "Construction of recombinant sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol." *J Biosci Bioeng* **87**(1): 43-48.
- Aly, C. (1987). "Filtration rates of mosquito larvae in suspensions of latex microspheres and yeast cells." *Entomol. exp. appl.* **46**: 55-61.
- Aspelin, A. L. (1997). "Pesticides Industry Sales and Usage: 1994-95 Market Estimates." U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Balasubramanian, A., N. Balaji, N. Gautham and K. Ponnuraj (2013). "Molecular dynamics simulation and molecular modelling studies on the insecticidal domain from jack bean urease." *Molecular Simulation* **39**(5): 357-366.
- Balasubramanian, A. and K. Ponnuraj (2010). "Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure." *J Mol Biol* **400**(3): 274-283.
- Barros, P. R., H. Stassen, M. S. Freitas, C. R. Carlini, M. A. Nascimento and C. Follmer (2009). "Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases." *Biochim Biophys Acta* **1794**(12): 1848-1854.
- Basso, C., S. Romero, R. M. Caffera, I. Roche, C. González, E. García da Rosa, R. Lairihoy, M. Gamboa, W. Norbis and R. da Rosa (2011). Diagnóstico ecosistémico de la situación del vector del Dengue en al ciudad de Salto. Montevideo: Universidad de la República.
- Berry, C., S. O'Neil, E. Ben-Dov, A. F. Jones, L. Murphy, M. A. Quail, M. T. Holden, D. Harris, A. Zaritsky and J. Parkhill (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." *Appl Environ Microbiol* **68**(10): 5082-5095.
- Bonning, B. C. and B. D. Hammock (1992). "Development and potential of genetically engineered viral insecticides." *Biotechnol Genet Eng Rev* **10**: 455-489.
- Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberon (2007). "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." *Toxicon* **49**(4): 423-435.
- Bregues, C., N. J. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet, S. Manguin, J. C. Morgan and J. Hemingway (2003). "Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti*

- is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene." Med Vet Entomol **17**(1): 87-94.
- Carlini, C. R. and M. F. Grossi-de-Sa (2002). "Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides." Toxicon **40**(11): 1515-1539.
- Carlini, C. R., A. E. Oliveira, P. Azambuja, J. Xavier-Filho and M. A. Wells (1997). "Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes." J Econ Entomol **90**(2): 340-348.
- Castiglioni, E., A. Ribeiro, R. Alzugaray, H. Silva, I. Avila and M. Loíacono (2010). "Prospección de parasitoides de huevos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (hemiptera: Pentatomidae) en el litoral oeste de Uruguay. ." Agrociencias, Uruguay **4**: 22-25.
- Cebollero, E., A. Martinez-Rodriguez, A. V. Carrascosa and R. Gonzalez (2005). "Overexpression of csc1-1. A plausible strategy to obtain wine yeast strains undergoing accelerated autolysis." FEMS Microbiol Lett **246**(1): 1-9.
- Chand-Goyal, T. and R. Spotts (1997). "Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts." BioControl(10): 199-206.
- Correa-Ferreira, B. S. and J. de Azevedo (2002). "Soybean seed damage by different species of stink bugs." Agricultural and Forest Entomology **4**: 145-150.
- Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi and D. R. Higgins (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." Mol Biotechnol **16**(1): 23-52.
- de Freitas Bueno, A., A. Farhat Pomari and A. R. Panizzi (2012). Soja- Manejo integrado de insetos e outros artrópodes pragas. Brasil.
- Dixon, N. E., T. C. Gazzola, R. L. Blakeley and B. Zermer (1975). "Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel?" J Am Chem Soc **97**(14): 4131-4133.
- Droby, S., A. Deus, B. Weiss, B. Horeu, E. Chalutz, H. Kats, M. Keren-Tzur and A. Shachnal (1998). "Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus." BioControl(12): 97-101.
- El-Ghaouth, A., J. L. Smilanick, G. E. Brown, A. Ippolito, M. Wisniewski and C. L. Wilson (2000). "Application of *Candida saitoana* and Glycolchitosan for the Control of Postharvest Diseases of Apple and Citrus Fruit Under Semi-Commercial Conditions." Plant Disease **84** (3): 243-248.

- Eraso, P. and C. Gancedo (1987). "Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth." FEBS Lett **224**(1): 187-192.
- Ferreira-DaSilva, C. T., M. E. Gombarovits, H. Masuda, C. M. Oliveira and C. R. Carlini (2000). "Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes." Arch Insect Biochem Physiol **44**(4): 162-171.
- Ferrer-Miralles, N. and A. Villaverde (2013). "Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue." Microb Cell Fact **12**: 113.
- Fillinger, U., B. G. Knols and N. Becker (2003). "Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya." Trop Med Int Health **8**(1): 37-47.
- Follmer, C., G. B. Barcellos, R. B. Zingali, O. L. Machado, E. W. Alves, C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes and C. R. Carlini (2001). "Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity." Biochem J **360**(Pt 1): 217-224.
- Fravel, D. R. (2005). "Commercialization and implementation of biocontrol." Annu Rev Phytopathol **43**: 337-359.
- Gatehouse, A. M., N. Ferry and R. J. Raemaekers (2002). "The case of the monarch butterfly: a verdict is returned." Trends Genet **18**(5): 249-251.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (2007). "Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." Nat Protoc **2**(1): 38-41.
- Goldberg, L. H. and J. Margalit (1977). "A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex inivitattos*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*." Mosq. News **37**: 335-358.
- Gomez, V. A., E. F. Gaona, O. R. Arias, M. B. De Lopez and O. E. Ocampos (2013). "Aspectos biológicos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) criados con diferentes dietas en condiciones de laboratorio." Rev. Soc. Entomolo. Argent. **72**((1-2)): 27-34.
- Hemingway, J. and H. Ranson (2000). "Insecticide resistance in insect vectors of human disease." Annu Rev Entomol **45**: 371-391.
- Herrera-Estrella, A. and I. Chet (1999). "Chitinases in biological control." EXS **87**: 171-184.
- Janisiewicz, W. J., B. Bastos Pereira, M. S. Almeida, D. P. Roberts, M. Wisniewski and E. Kurtenbach (2008). "Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia Pastoris*

- recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide." Postharvest Biology and Technology **47**: 218-225.
- Jones, R. W. and D. Prusky (2002). "Expression of an Antifungal Peptide in *Saccharomyces*: A New Approach for Biological Control of the Postharvest Disease Caused by *Colletotrichum coccodes*." Phytopathology **92**(1): 33-37.
- Junaid, J. M., N. A. Dar, T. A. Bhat, A. H. Bhat and M. A. Bhat (2013). "Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens " International Journal of Modern Plant & Animal Sciences **1**(2): 39-57.
- Kaplan, E. L. and P. Meier (1958). "Nonparametric Estimation from Incomplete Observations." Journal of the American Statistical Association **53**(282): 457-481.
- Margalith, Y. and E. Ben-Dov (2000). Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection. Boca Raton FL: CRC Press.
- Martinelli, A. H., K. Kappaun, R. Ligabue-Braun, M. S. Defferrari, A. R. Piovesan, F. Staniscuaski, D. R. Demartini, C. A. Dal Belo, C. G. Almeida, C. Follmer, H. Verli, C. R. Carlini and G. Pasquali (2014). "Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease." Biochim Biophys Acta **1840**(3): 935-944.
- Masoud, W., L. B. Cesar, L. Jespersen and M. Jakobsen (2004). "Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis." Yeast **21**(7): 549-556.
- Masuh, H., E. Seccacini, S. de Licastro and E. Zerba (2002). "Residualidad de un formulado sólido de insecticida microbiano Bti (H-14) en el control de las larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." Revista Peruana de Epidemiología **10**(7): 245-248.
- Moreira, K. E., T. C. Walther, P. S. Aguilar and P. Walter (2009). "Pill controls eisosome biogenesis." Mol Biol Cell **20**(3): 809-818.
- Muhlrad, D., R. Hunter and R. Parker (1992). "A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes." Yeast **8**(2): 79-82.
- Mulinari, F., M. A. Freitas-Silva, M. F. Grossi-de-Sa, M. G. Moraes, E. Kurtenbach and C. R. Carlini (2004). "Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas." Patente: deposit en 08/04/2004, in INPI-RS: number 00112.
- Mulinari, F., F. Staniscuaski, L. R. Bertholdo-Vargas, M. Postal, O. B. Oliveira-Neto, D. J. Rigden, M. F. Grossi-de-Sa and C. R. Carlini (2007). "Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived

- from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*." Peptides **28**(10): 2042-2050.
- Panizzi, A. R. (1987). "Nutritional ecology of seed-sucking insects of soybeans and their management." Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Internal Symposium on Insects **82**(III): 161-175.
- Panizzi, A. R. (1997). "Wild hosts of Pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops." Annu Rev Entomol **42**: 99-122.
- Paris, M., J. P. David and L. Despres (2011). "Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*." Ecotoxicology **20**(6): 1184-1194.
- Pires-Alves, M., M. F. Grossi-de-Sa, G. B. Barcellos, C. R. Carlini and M. G. Moraes (2003). "Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]." Plant Cell Physiol **44**(2): 139-145.
- Porro, D., M. Sauer, P. Branduardi and D. Mattanovich (2005). "Recombinant protein production in yeasts." Mol Biotechnol **31**(3): 245-259.
- Postal, M., A. H. Martinelli, A. B. Becker-Ritt, R. Ligabue-Braun, D. R. Demartini, S. F. Ribeiro, G. Pasquali, V. M. Gomes and C. R. Carlini (2012). "Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides." Peptides **38**(1): 22-32.
- Punja, Z. K. and R. S. Utkhede (2003). "Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases." Trends Biotechnol **21**(9): 400-407.
- Ramirez, M. and J. Ambrona (2008). "Construction of sterile ime1Delta-transgenic *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts unable to disseminate in nature." Appl Environ Microbiol **74**(7): 2129-2134.
- Ren, X., Q. Kong, H. Wang, W. Zhou and X. Zheng (2012). "Biocontrol of fungal decay of citrus fruits by *Pichia Pastoris* recombinant strains expressing cecropin A." Food Chemistry **131**: 796-801.
- Ribeiro, A. and E. Castiglioni (2008). "Caracterización de las poblaciones de enemigos naturales de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae)." Agrociencias, Uruguay XII (2): 48-56.
- Ribeiro, A. and E. Castiglioni (2008). "Fluctuaciones de poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) y caracterización de sus enemigos naturales en soja y alfalfa." Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias.: Montevideo, Facultad de Agronomía.
- Rodriguez, M. M., J. A. Bisset, L. H. Mila, E. Calvo, C. Diaz and L. Alain Soca (1999). "Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba." Rev Cubana Med Trop **51**(2): 83-88.

- San Martin, J. L., O. Brathwaite, B. Zambrano, J. O. Solorzano, A. Bouckenoghe, G. H. Dayan and M. G. Guzman (2010). "The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality." Am J Trop Med Hyg **82**(1): 128-135.
- Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell and P. Christou (2011). "Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications." Plant Biotechnol J **9**(3): 283-300.
- Shelton, A. M. and F. R. Badenes-Perez (2006). "Concepts and applications of trap cropping in pest management." Annu Rev Entomol **51**: 285-308.
- Simon, J. Y. (2008). The Toxicology and Biochemistry of Insecticides, CRC Press.
- Staniscuaski, F., V. Te Brugge, C. R. Carlini and I. Orchard (2009). "Invitro effect of Canavalia ensiformis urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on Rhodnius prolixus Malpighian tubules." J Insect Physiol **55**(3): 255-263.
- Tauil, P. L. (2001). "Urbanizaçao e ecología do dengue." Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro **17**: 99-102.
- Templeton, G. E. and R. J. Smith (1977). Managing weeds with pathogens. Plant disease: an advanced treatise., Academic Pres, New York.
- Tomazetto, G., F. Mulinari, F. Staniscuaski, B. Settembrini and C. R. Carlini (2007). "Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E.coli encoding urease derived peptide with bioinsecticide activity." Enz. Microb. Technol.(41): 821-827.
- Unger, T., Y. Jacobovitch, A. Dantes, R. Bernheim and Y. Peleg (2010). "Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression." J Struct Biol **172**(1): 34-44.
- van den Ent, F. and J. Lowe (2006). "RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids." J Biochem Biophys Methods **67**(1): 67-74.
- Whalon, M. E. and B. A. Wingerd (2003). "Bt: mode of action and use." Arch Insect Biochem Physiol **54**(4): 200-211.
- Wilson, C. and C. Tisdell (2001). "Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs." Ecological Economics **39**: 449-462.
- Zehnder, G., G. M. Gurr, S. Kuhne, M. R. Wade, S. D. Wratten and E. Wyss (2007). "Arthropod pest management in organic crops." Annu Rev Entomol **52**: 57-80.
- Zerbino, S. and R. Alzugaray (2003). Piezodorus guildinii (Westwood). Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Facultad de Agronomía, Uruguay.

Zuñiga, C., J. Peraza and E. Hernández (2009). "Abordando la problemática del dengue desde una perspectiva ambiental." Tecnología en Marcha **22**(1): 81-89.