

Evaluación de la actividad de un péptido antimicrobiano de Ibirapitá utilizando diferentes vectores de expresión para su producción recombinante

Milagros Zerpa¹, Susana Rodríguez-Decuadro¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) forman parte de la inmunidad innata de plantas y participan también en procesos fisiológicos de las mismas. Además de presentar actividad contra fitopatógenos, se ha encontrado que los AMPs vegetales presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a agentes patógenos causantes de infecciones en humanos y animales. Nuestro grupo de trabajo ha aislado el gen de un AMP de la familia de las esnaquinas, presente en brotes de *Peltophorum dubium* (ibirapitá). Esta esnaquina, denominada PdSN1 fue expresada de forma heteróloga en *Escherichia coli* utilizando el sistema Rosetta-gami/pET102. El plásmido utilizado incluye a la proteína Tiorredoxina, como proteína de fusión, que fue eliminada utilizando la proteasa Enteroquinasa. Si bien el péptido liberado presentó actividad contra patógenos vegetales y humanos, este proceso disminuye los rendimientos y aumenta los costos de producción. En este trabajo se propone evaluar otros vectores de expresión con el fin de optimizar las condiciones de producción y con la posibilidad de visualizar mediante microscopia el modo de acción de estos péptidos. Se seleccionaron los plásmidos pET28a y pET-His6-GFP-TEV-LIC, obteniendo en el primer caso His6-PdSN1 y en el segundo caso His6-GFP-PdSN1. En éste último, el péptido se puede liberar de la GFP con la enzima TEV. La secuencia PdSN1 correspondiente al péptido maduro fue subclonada en los vectores seleccionados utilizando *restriction-free cloning*. Se transformaron cepas de *E. coli* Rosetta-gami y luego de la inducción con IPTG y crecimiento a 28°C por 24 hs, en ambos sistemas se recuperó el péptido recombinante en la fracción soluble en cantidades adecuadas para su purificación, mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺. Actualmente se están realizando ensayos de actividad antimicrobiana mediante CIM contra los fitopatógenos *Colletotrichum* spp y *Botrytis cinerea* con los péptidos His6-PdSN1, His6-GFP-PdSN1 y Trx-PdSN1-His6. Se compararán los valores CIM y en el caso de que His6-GFP-PdSN1, presente actividad contra alguno de los hongos evaluados, será utilizado para comenzar a estudiar el modo de acción de PdSN1 contra dicho patógeno. Además, el péptido His6-PdSN1 podrá ser utilizado en futuras líneas de investigación enfocadas en el desarrollo de productos útiles para el tratamiento o el control efectivo de enfermedades.