

## BÚSQUEDA, CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Maidana, M.<sup>1</sup> Murchio, S.<sup>1</sup> Schwartzman, C. <sup>1</sup> Leoni, C.<sup>2</sup> Blumwald, E.<sup>3</sup> Dalla Rizza, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de proteínas, Unidad Técnica de Biotecnología, INIA Las Brujas

<sup>2</sup>Unidad de Fitopatología, INIA Las Brujas

<sup>3</sup>Department of Plant Science, University of California

\* E-mail: [matiasmaidana@gmail.com](mailto:matiasmaidana@gmail.com)

**Palabras claves:** Fito patógenos, péptidos antimicrobianos, bio reactores.

### Introducción

En el Laboratorio de Proteínas (LP) de la Unidad Técnica de Biotecnología (UTBio) en INIA Las Brujas, se desarrolla un proyecto de búsqueda y caracterización de péptidos antimicrobianos (AMP) como alternativa para el control de fitopatógenos de poscosecha. Los AMP son efectores de la inmunidad innata que están presentes en una amplia variedad de organismos que van desde bacterias y hongos hasta mamíferos y plantas superiores (Yokoyama et al. 2009). Los organismos blanco reportados son bacterias, hongos, virus, protozoarios y células tumorales. Esta línea de investigación descansa sobre una base de tres componentes esenciales: la identificación de potenciales fuentes de péptidos, la purificación y caracterización de los mismos, y la producción heteróloga de los AMP (Dalla Rizza et al. 2008).

### Búsqueda y caracterización

A la fecha el laboratorio ha identificado más de 20 extractos proteicos de diferentes especies vegetales con actividad antimicrobiana con valores de MIC (Mínima concentración inhibitoria) de 1,5 a 125 µg/ml (Larrañaga et al. 2012).

A partir de semillas de *Amaranthus quitensis*, se identificaron péptidos antimicrobianos pertenecientes a la familia de heveínas, Aq-AMP1 y Aq-AMP2. Ambos péptidos tienen una masa de 3 kDa aproximadamente, con actividad biológica frente a diferentes hongos filamentosos mostrando valores de MIC menores a 10 µM. Particularmente Aq-AMP2, es un péptido antimicrobiano de 3181 Da, su estructura tridimensional de dos hojas β y una hélice α está estabilizada por 3 puentes disulfuros, con un dominio de unión a quitina. Durante la biosíntesis del péptido existe un precursor pre-propéptido de 86 aminoácidos (aa) con tres regiones bien identificadas; un péptido señal de 25 aa en amino terminal (N-ter) de transporte a retículo endoplásmico (ER), la región codificante del péptido maduro de 30 aa y en carboxilo terminal (C-ter) una señal de 26 aa de transporte a vacuola (Bolte et al. 1993). Este péptido presenta actividad antifúngica reportada contra 18 especies de hongos filamentosos de interés agropecuario con valores de MIC entre 4 y 8 µM, no presenta actividad hemolítica ni fitotóxica. Otras características interesantes de este AMP son su estabilidad térmica y resistencia a la degradación proteolítica. Debido a su baja biodisponibilidad en la fuente natural la producción heteróloga se vuelve fundamental para poder evaluar su comportamiento *in-vivo*.

### Producción heteróloga

Dentro del proyecto se busca abordar diferentes plataformas de expresión con el fin de poder evaluar la relación costo-producción de cada una. Las plataformas planteadas para trabajar son *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, células de insecto y plantas como biorreactores.

En colaboración con la unidad de proteínas recombinantes (UPR) del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont) se comenzó trabajando en la plataforma procariota *E. coli*, siendo

necesario el empleo de proteínas de fusión para obtener un correcto plegamiento debido a la carencia de sistema endomembranoso de la bacteria. Se logró producir péptido activo fusionado a tioredoxina (Aq-AMP2-Trx) que mostró similar actividad a la observada *in-vitro* con el péptido purificado, con valores MIC de 4µM y no observándose actividad inhibitoria en la proteína de fusión. El comportamiento de Aq-AMP2-Trx *in-vivo* fue evaluado mediante el control del hongo *Penicillium digitatum* en la planta de empaque de naranjas en Salto Grande. El péptido fusionado a tiorredoxina a una concentración 64 µM logró controlar el 62% de las infecciones con respecto al grupo control conteniendo solo Trx (Alem & Díaz-Dellavalle 2014). Si bien la actividad antifúngica observada *in-vivo* resultó promisorias, sería esperable que su eficiencia mejore sin la proteína de fusión.

Con el fin de buscar una plataforma de expresión eucariota y teniendo en cuenta que Aq-AMP2 proviene de semilla, se analizó el empleo de plantas como biorreactores. Se diseñaron construcciones en vectores plasmídicos para la producción tejido específica en plantas de *Brachypodium distachyon* comúnmente empleado como modelo de transformación en cereales. El endosperma de semilla es un órgano de almacenamiento que brinda condiciones óptimas para la acumulación y conservación activa de proteínas de reserva. Con este fin se identificaron promotores que difieren en la expresión y momento de desarrollo de la planta: un promotor de ubiquitina de *B.distachyon* BdUbi-10, un promotor de glutelinas de *B.distachyon* BdGlu-1 y un promotor de glutelinas de arroz OsGt13a<sup>s</sup>. El gen de interés consiste en la región codificante completa del pre-propéptido antimicrobiano Aq-AMP2 y como gen reportero se empleó *gusA*, codificante de β-Glucuronidasa. En colaboración con el grupo del Dr. Eduardo Blumwald de la Universidad de Davis se generaron 6 construcciones diferentes las que se utilizaron para transformar *B. distachyon*. Se obtuvieron 18 eventos de BdUbi-10-Aq-AMP2, 43 eventos de BdUbi-10-*gusA*, 23 eventos de BdGlu-1-Aq-AMP2, 5 eventos de BdGlu-1-*gusA*, 2 eventos de OsGt13a-Aq-AMP2 y 41 eventos de OsGt13a-*gusA*. A partir de éstos eventos primarios se colectaron semillas (T1) para su evaluación bajo condiciones de bioseguridad en el laboratorio de la UTBio. Las plantas T1 fueron crecidas en agar-agua con

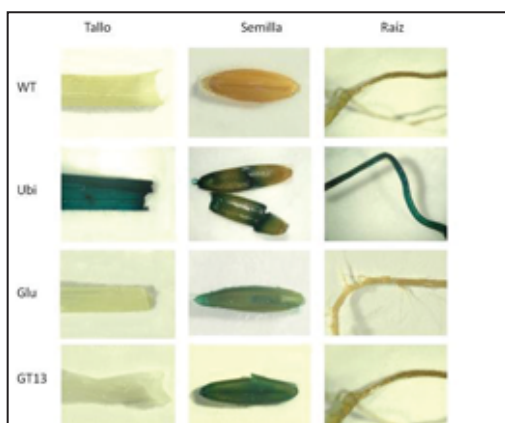


Figura 1. Detección de actividad β-Glucuronidasa en tallo, semilla y raíz de distintas líneas transgénicas de *B. distachyon*, según promotor empleado.

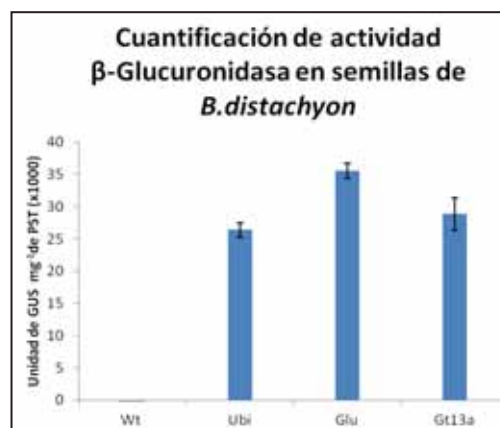


Figura 2. Cuantificación de acumulación de β-Glucuronidasa en endosperma de semilla en función del promotor empleado .

Higromicina 25µg/ml con el fin de seleccionar sólo aquellas resistentes las que fueron posteriormente confirmadas por PCR. La evaluación cualitativa de los eventos correspondientes al gen reportero se realizó empleando el sustrato artificial X-glc que genera un compuesto azul al ser clivado por la enzima, tomando como grupo control plantas *B. distachyon* sin transformar (WT) (Fig. 1)(Jefferson et al. 1987). Los resultados confirmaron la

expresión tejido específica del reportero. Se observó actividad en tallo, raíz y semillas en distintos eventos con el promotor BdUbi10 mientras que los eventos con el promotor BdGlu-1 y OsGt13a solo mostraron coloración en las semillas. Cabe destacar que el grupo control (WT) no desarrolló coloración en ningún tejido. Para determinar el nivel de expresión en función de los promotores empleados se realizó el ensayo de cuantificación de actividad glucuronidasa en proteínas solubles totales (PST) de semillas (Kabbage et al. 2011). Como sustrato se utilizó 4-MUG, (4-Metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronido) que se convierte en un fluoróforo capaz de absorber a 355nm y emitir a 450nm luego de ser clivado por la enzima. Los resultados preliminares indican que los eventos con mejor acumulación de  $\beta$ -Glucuronidasa en semilla son los que se encuentran regulados por el promotor específico de glutelinas pBdGlu1, mientras que tanto pBdUbi-10 como pOsGt13a presentaron menor nivel de acumulación, y no se observó actividad en el WT (Fig.2). Se continuará con la evaluación de los eventos transformados con el péptido antimicrobiano Aq-AMP2, seleccionando aquellos eventos con mejores niveles de expresión.

## Bibliografía

- Alem, D. & Díaz-Dellavalle, P., 2014. In Search of Topical Agricultural Biofungicides: Properties of the Recombinant Antimicrobial Peptide Trxaq-AMP Obtained from *Amaranthus quitensis*. *J Microb Biochem ...*, 6(5), pp.268–273. Available at: <http://omicsonline.org/open-access/in-search-of-topical-agricultural-biofungicides-properties-of-the-recombinant-antimicrobial-peptide-trxaqamp-obtained-from-amaranthus-quitensis-1948-5948.1000155.pdf>.
- Bolle, M.F.C. et al., 1993. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. *Plant Molecular Biology*, 22(6), pp.1187–1190.
- Dalla Rizza, M. et al., 2008. Biomolecules as host defense weapons against microbial pathogens. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 2(2), pp.82–96.
- Jefferson, R. a, Kavanagh, T. a & Bevan, M.W., 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), pp.3901–3907.
- Kabbage, M., Ek-Ramos, M. & Dickman, M., 2011. A  $\beta$ -glucuronidase (GUS) based cell death assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (May), pp.4–7.
- Larrañaga, P. et al., 2012. Activity of Naturally Derived Antimicrobial Peptides against Filamentous Fungi Relevant for Agriculture. *Sustainable Agriculture Research*, 1(2), pp.211–221.
- Yokoyama, S. et al., 2009. The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *Journal of Peptide Science*, 15(7), pp.492–497.