



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Licenciatura en Biotecnología y Biología
Molecular

Defensinas de flores de *Silybum marianum* con potencial aplicación antimicrobiana

Agustina Fernandez

Dirección: Dra. Sandra Vairo Cavalli

Agosto 2015

Defensinas de flores de *Silybum marianum* con potencial aplicación antimicrobiana



Laboratorio de Procesos Biotecnológicos
Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Exactas –UNLP

Dirección: Dra. Sandra Vairo Cavalli

Lugar de trabajo: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe)

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por todo el conocimiento brindado.

Al CIProVe, su director Néstor O. Caffini y todas las personas que allí conocí.

A Sandra Vairo Cavalli y María Laura Colombo por la dedicación, esfuerzo y paciencia con que me enseñaron y el tiempo brindado a lo largo de este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por haberme otorgado la beca de entrenamiento.

A mi familia y amigos.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1: Introducción | 1 |
| 1.1 Inmunidad innata en plantas | 2 |
| 1.2 Péptidos antimicrobianos | 4 |
| 1.3 Defensinas | 6 |
| 1.3.1.1 Localización | 8 |
| 1.3.3.2 Conservación secuencial y conformación estructural | 9 |
| 1.3.3.3 Clasificación | 11 |
| 1.3.3.4 Mecanismos de acción | 14 |
| 1.4 Recombinación sitio específica mediante el sistema <i>Gateway</i> | 15 |
| CAPÍTULO 2: Objetivos | 19 |
| 2.1 Objetivos generales | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos | 21 |
| CAPÍTULO 3: Materiales y Métodos | 22 |
| 3.1 Materiales | 23 |
| 3.1.1 Cepas bacterianas | 23 |
| 3.1.2 Medios de cultivo | 23 |
| 3.1.3 Buffers | 23 |
| 3.1.4 Soluciones de antibiótico | 24 |
| 3.1.5 Vectores plasmídicos | 24 |
| 3.1.6 Cebadores | 25 |
| 3.1.7 Enzimas recombinantes | 25 |
| 3.2 Herramientas Bioinformáticas | 26 |
| 3.2.1 Herramientas generales | 26 |
| 3.2.2 Herramientas empleadas para el modelado molecular por homología .. | 27 |
| 3.3 Metodologías | 27 |
| 3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos | 27 |
| 3.3.2 Obtención de células competentes químicas | 28 |
| 3.3.2.1 Método de cloruro de calcio | 28 |
| 3.3.2.2 Método de cloruro de rubidio | 29 |
| 3.3.3 Transformación por shock térmico | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.4 Extracción de ADN plasmídico..... | 29 |
| 3.3.4.1 Método de lisis alcalina con unión a sílica..... | 30 |
| 3.3.4.2 Kit comercial..... | 30 |
| 3.3.5 Reacciones de PCR..... | 30 |
| 3.3.5.1 Condiciones de amplificación por PCR..... | 31 |
| 3.3.5.2 <i>Colony</i> -PCR..... | 32 |
| 3.3.6 Electroforesis en geles de agarosa..... | 33 |
| 3.3.7 Purificación de DNA a partir de gel utilizando un kit comercial..... | 33 |
| 3.3.8 Reacción de recombinación BP clonasa | 34 |
| 3.3.9 Reacción de recombinación LR clonasa..... | 35 |
| 3.3.11 Modelado molecular por homología del dominio defensina..... | 36 |
| 3.3.11.1 Construcción del modelo molecular..... | 36 |
| 3.3.11.2 Evaluación del modelo obtenido..... | 37 |
| 3.3.12 Predicción funcional..... | 38 |
| CAPÍTULO 4: Resultados y Discusión..... | 39 |
| 4.1 Resultados | 40 |
| 4.1.1 Diseño experimental | 40 |
| 4.1.2.1 Clonación del dominio defensina en el vector pDONR221..... | 42 |
| 4.1.2.2 Clonación del dominio defensina en el vector p0GWA..... | 45 |
| 4.1.3.1 Modelado molecular por homología..... | 47 |
| 4.1.3.2 Evaluación del modelo tridimensional obtenido..... | 49 |
| 4.1.3.3 Predicción funcional..... | 51 |
| 4.2 Discusión..... | 53 |
| CAPÍTULO 5: Conclusiones y Perspectivas | 57 |
| CAPÍTULO 6: Material Suplementario | 59 |
| Material Suplementario 6.1 | 60 |
| Material Suplementario 6.2 | 61 |
| Material Suplementario 6.3 | 62 |
| Material Suplementario 6.4 | 63 |
| CAPÍTULO 7: Referencias Bibliográficas..... | 64 |

CAPÍTULO 1: **Introducción**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La totalidad de los organismos vivos, desde microorganismos hasta plantas y animales, ha desarrollado mecanismos que les permiten defenderse frente al ataque de patógenos, con los cuales han coevolucionado. Los mecanismos más sofisticados de defensa consisten en la producción de anticuerpos y células asesinas naturales, que son capaces de reconocer y eliminar invasores específicos, respectivamente, y que componen la respuesta inmune adaptativa exclusiva de los vertebrados superiores (Thomma et al. 2002). También existe, por otro lado, la denominada inmunidad innata que es mucho más antigua desde el punto de vista evolutivo, se encuentra ampliamente distribuida entre organismos y, a diferencia de la inmunidad adaptativa, carece de la especificidad de reconocimiento de antígenos. Sin embargo, esta respuesta no es completamente inespecífica, sino que permite al huésped reconocer un pequeño número de motivos conservados denominados PAMPs—patrones moleculares asociados a patógenos—a través de receptores presentes en las células—PRRs o receptores de reconocimiento de patrón—(Akira et al. 2006). Dentro de la inmunidad innata se incluye la producción de péptidos antimicrobianos (PA) que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos (Stotz et al. 2013).

1.1 Inmunidad innata en plantas

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra una eventual invasión de un patógeno. Tanto para vertebrados como para insectos, las bases moleculares de este fenómeno han sido descritas con gran detalle. En el caso de las plantas, los estudios acerca de esta respuesta son más recientes y han permitido evidenciar mecanismos similares, aunque con marcadas diferencias (Nürnberg et al. 2004).

Las plantas, que están constantemente expuestas a plagas y patógenos en la naturaleza, no pueden moverse para escapar de condiciones ambientales desfavorables. Para combatir el estrés biótico causado por diferentes patógenos (tales como hongos, bacterias, o insectos) han evolucionado mecanismos que les

permiten percibir estos ataques y convertir esa percepción en una respuesta. A diferencia de los mamíferos, las plantas carecen de células de defensa móviles y de un sistema inmune adaptativo. En contraste, la defensa se basa en la inmunidad innata de cada célula y en las señales procedentes de los sitios de infección (Jones & Dangl 2006), además de contar con defensas preformadas que les confieren protección frente a patógenos (Newman et al. 2013).

En general, la mayoría de las especies vegetales son resistentes a la mayor parte de los potenciales invasores microbianos. Este fenómeno es conocido como *resistencia o inmunidad no hospedante*. En principio, las plantas se encuentran protegidas por dos barreras físicas preformadas, la cutícula y la pared celular, y por compuestos antimicrobianos expresados en forma constitutiva. La cutícula se encuentra presente en la superficie externa de las células epidérmicas y está compuesta por cutina y ceras, por lo que constituye una barrera contra fitopatógenos y plagas. La pared celular, por su composición, proporciona además de sostén estructural a la célula vegetal, protección frente a estreses bióticos y abióticos. La combinación de cutícula y pared celular puede ser permeable para algunos hongos patógenos, pero las bacterias no pueden penetrar la epidermis, a excepción de zonas con aperturas naturales tales como estomas, hidatodos, nectarios, lenticelas, o a menos que se encuentre dañada (Bigéard et al. 2015).

Aquellos patógenos que logren romper las barreras preformadas deben enfrentar el sistema inmune de la planta, que está constituido por sofisticados mecanismos de reconocimiento de patógenos y de defensa.

El primer nivel del sistema inmune de la planta incluye el reconocimiento del patógeno en la membrana plasmática de las células vegetales. Una gran cantidad de productos asociados a los microorganismos (los denominados PAMPs o elicitores generales) son los inductores de la respuesta inmune innata en la interacción planta-microorganismo y son reconocidos a través de receptores (PRRs) localizados en la membrana celular. Esta respuesta, activada por patógenos virulentos en huéspedes susceptibles, es conocida como *resistencia basal u horizontal* e involucra a la denominada inmunidad disparada por PAMPs o *PTI–PAMPs-triggered immunity* (Newman et al. 2013).

Existe también otro tipo de resistencia, denominada *resistencia específica o vertical*, que se da a nivel de subespecie. A lo largo de la evolución, los fitopatógenos han logrado superar la resistencia de las plantas a través de la adquisición de factores de virulencia que les permitieron evadir o suprimir los mecanismos de defensa del huésped. Sin embargo, como resultado de la coevolución, las plantas adquirieron genes de resistencia que permiten el reconocimiento en forma específica de los factores de virulencia del patógeno y evitar entonces la infección. Esto ha sido descrito por la hipótesis “gen a gen”, propuesta por Flor en 1942, que explica que el producto de un gen de avirulencia (Avr) de un patógeno (o elicitor) es reconocido por el producto de un gen de resistencia (R) de la planta (Nürnberg et al. 2004). Esta respuesta más específica se denomina inmunidad disparada por efector o ETI—*Effector-triggered immunity*.

En respuesta a un patógeno las plantas son capaces de producir una gran diversidad de factores de defensa dentro de los cuales se incluyen fitoalexinas, fitoanticipinas, fenoles, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos y una amplia gama de proteínas y péptidos antimicrobianos (Lacerda et al. 2014).

1.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PA) poseen un rol central en la defensa contra microorganismos y constituyen un elemento fundamental dentro de la inmunidad innata (Boman 1995). Son polipéptidos de menos de 100 aminoácidos que poseen actividad antimicrobiana a concentraciones fisiológicas en las condiciones existentes en el tejido de origen (Ganz 2003). Comprenden un conjunto estructuralmente diverso, producidos por distintos tipos de células, se expresan de manera constitutiva o inducible según el organismo y el tejido en el que se encuentren al momento de la infección y son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos patógenos a través de múltiples mecanismos de acción (Téllez & Castaño 2010).

Los PA, si bien no reconocen un antígeno específico, se producen simplemente por transcripción y traducción de un gen y se liberan relativamente

rápido luego de una infección con un gasto reducido de energía y biomasa (Thomma et al. 2002).

La mayor parte de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, es decir, poseen carga neta positiva a un pH fisiológico debido al gran contenido de arginina y lisina en relación con el de ácido aspártico y ácido glutámico (Télez & Castaño 2010). A pesar de su diversidad estructural, una característica común entre los péptidos antimicrobianos catiónicos es que poseen una estructura anfipática que les posibilita la unión a membranas celulares. De hecho, existe evidencia de que uno de los blancos de los PA es la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática. (Yeaman & Yount 2003).

Estos péptidos se han identificado preferentemente en zonas del organismo potencialmente expuestas a patógenos. En las plantas, se producen en los primordios foliares, en las células que recubren la cavidad subestomática, en la epidermis y en los estomas (García-Olmedo et al. 1998).

Los PA de plantas son péptidos ricos en cisteína que pertenecen a distintas familias incluyendo tioninas, péptidos tipo heveína, ciclótidos, proteínas de transferencia de lípidos y defensinas (Astafieva et al. 2012).

Las plantas silvestres y las hierbas, cuya perfecta adaptación a los cambios del entorno se traduce en una mayor resistencia a las enfermedades, proporcionan una valiosa, aunque poco explorada, fuente de antimicrobianos. Las flores también constituyen una fuente relativamente inexplorada de PA con potenciales propiedades biotecnológicas. Actualmente es un área de creciente investigación para el mejoramiento potencial de la defensa de plantas de cultivos naturales a través de la aplicación de tecnologías transgénicas (Lacerda et al. 2014).

1.2.1 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

La actividad de los PA se lleva a cabo a través de diferentes mecanismos de acción que dependen del tipo de péptido y del organismo con el que interacciona. Algunos de los mecanismos descritos son:

- i. La interacción electrostática entre aminoácidos catiónicos de los PA con las cargas negativas de los componentes de la membrana plasmática (Anaya-López et al. 2005).
- ii. La interacción de los PA con moléculas blanco intracelulares (Brogden 2005).

Como se mencionó previamente, una de las características de los PA es la organización anfipática de la molécula como consecuencia de la conformación espacial de los aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos que se agrupan en regiones discretas alejadas entre sí. Esta disposición favorece la interacción de las regiones catiónicas de estos péptidos con las cargas negativas de los grupos polares de los fosfolípidos de las membranas celulares o con moléculas con carga negativa. Se han descrito varios modelos para explicar la permeabilización de membranas producida por los PA, de los cuales se pueden nombrar el modelo de barril-bastón, el modelo de alfombra y el modelo toroidal de poros (Brogden 2005).

1.3 Defensinas

Las defensinas comprenden un conjunto amplio de péptidos antimicrobianos que difieren en longitud, número de cisteínas en la secuencia, enlaces y plegamiento. Son componentes fundamentales del sistema inmune innato y se han identificado en moluscos, mamíferos (incluyendo a los humanos), insectos, hongos y plantas, entre otros (Figura 1).

1.3.1 Defensinas de plantas

Las defensinas de plantas son pequeños péptidos catiónicos de 45-54 aminoácidos (con un peso de aproximadamente 5 kDa) con un patrón conservado de seis a ocho residuos de cisteína. Estas cisteínas pueden formar de tres a cuatro puentes disulfuro (Lacerda et al. 2014), lo cual confiere a estos péptidos una gran estabilidad estructural y termodinámica (Lay & Anderson 2005). Las defensinas pueden expresarse en forma constitutiva en órganos de almacenamiento y reproductivos, o bien producirse luego del ataque de un patógeno o una herida como parte de la respuesta sistémica de defensa.

Además, la producción de defensinas también puede ser inducida en respuesta al estrés ambiental, como sequía, y en respuesta a hormonas incluyendo al metil jasmonato, ácido salicílico y etileno (Vriens et al. 2014).

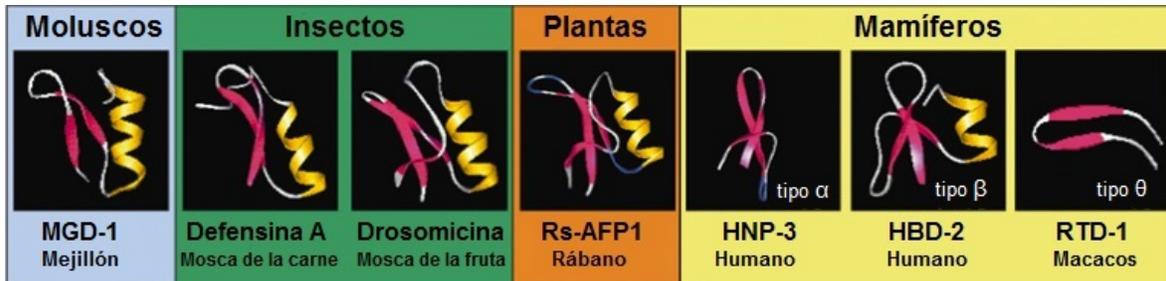


Figura 1. Estructura tridimensional de distintas defensinas. Se muestran las estructuras de defensinas de plantas, invertebrados (insectos y moluscos) y vertebrados (mamíferos). Números de acceso de PDB: MGD-1: 1FJN; Defensina A: 1ICA; Drosomicina: 1MYN; Rs-AFP1: 1AYJ; HNP-3: 1DFN; HBD-2:1FD3; RTD-1: 1HVZ. Las α -hélices y las hojas β se muestran en amarillo y rojo, respectivamente (Thomma et al. 2002).

Los primeros miembros de esta familia fueron aislados a partir del endosperma de trigo y cebada y fueron originalmente llamadas γ -tioninas (γ -purotionina y γ -hordotionina, respectivamente) debido a que mostraban una marcada similitud en tamaño, carga y contenido de cisteína que las α y β tioninas, aunque el espaciamiento de las cisteínas era diferente. En los años siguientes, varias proteínas tipo γ -tioninas fueron identificadas. En 1995, Terras y colaboradores (quienes aislaron dos proteínas de este tipo con actividad antifúngica a partir de semillas de *Raphanus sativus*, Rs-AFP1 y Rs-AFP2) acuñaron el término defensinas vegetales, ya que notaron que estas proteínas estaban más relacionadas con las defensinas de insectos y mamíferos que con las tioninas vegetales a nivel de estructura primaria y tridimensional (Lay & Anderson 2005).

Estas pequeñas proteínas vegetales comparten homología estructural y funcional con defensinas de insectos, mamíferos y hongos. Muchas defensinas vegetales poseen actividad antifúngica, sin embargo muchas otras actividades han sido descritas, incluyendo actividad antibacteriana, inhibición de tripsina y α -amilasa, inhibición de la síntesis proteica, incluso algunas defensinas están involucradas en la tolerancia a metales pesados y en el desarrollo. Si bien hay defensinas que comparten actividades similares, como las antifúngicas, éstas

pueden actuar mediante diferentes mecanismos de acción (Van der Weerden & Anderson 2013).

Las defensinas de plantas son codificadas por pequeñas familias multigénicas. El análisis del genoma de *A. thaliana* reveló la presencia de 13 genes que codifican defensinas vegetales putativas y a su vez se encontraron dos genes que codifican para proteínas putativas que contienen dominios tipo defensina (Lay & Anderson 2005).

En los últimos años, las defensinas vegetales han comenzado a probarse como herramientas biotecnológicas para mejorar la producción de cultivos a través de la generación de organismos genéticamente modificados (OGM) resistentes a hongos. Su baja concentración efectiva, entre 0,1 a 10 μM , así como su inocuidad para mamíferos y aves, las convierte en una mejor opción para el control de infecciones fúngicas en los campos de cultivo en lugar de los productos químicos. Así también, otro uso potencial lo constituye la producción de biofungicidas basados en defensinas (Lacerda et al. 2014).

1.3.1.1 Localización

La ubicación de las defensinas en las plantas es consistente con el rol de defensa que cumplen. Se han identificado defensinas en hojas, tubérculos, flores, vainas y semillas, jugando un papel importante en la protección de la germinación y de las plántulas en desarrollo. Estas proteínas se localizan preferentemente en las capas celulares periféricas, se han encontrado defensinas en el xilema, en células estomáticas, y en células que recubren la cavidad subestomática, todas locaciones donde potencialmente se puede producir la entrada y el primer contacto con los patógenos (García-Olmedo et al. 1998).

1.3.3.2 Conservación secuencial y conformación estructural

En general, en las defensinas vegetales existe una clara, aunque limitada, conservación de secuencia (Figura 2).

| Planta | Nombre | Secuencia |
|--------------------------------|--------------|---|
| | | * 20 * 40 * 60 |
| <i>Nicotiana alata</i> | Nad1 | ----R-ECKTESNTF-PCICITKPPGRKACIS--E-KFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | FST | ----R-ECKTESNTF-PCICITKPPGRKACIS--E-KFT-DEHCSK--L---LRRGLCTKPK- |
| <i>Nicotiana excelsior</i> | NeThio1 | ----R-ECAR--EIE-TEICITNPGGRKACIK--E-KFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Nicotiana excelsior</i> | NeThio2 | ----K-DEKTESNTF-PCICITKPPGRKACIK--E-KFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Nicotiana paniculata</i> | NpThio1 | ----K-STCKAESNTF-PCICITKPPGRKACLS--E-KFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | TPP3 | ----Q-IOKAPSQTF-PCICFMDSSGRKYCIK--E-KFT-GEHCSK--L---QRKLOCTKPK- |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | TGAS118 | ----R-TCESQSHRF-KCECVSEKNGASVCET--E-GFS-GEICRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Petunia hybrida</i> | PhD1 | ----A-TCKAECTPT-DSVGINKKKQVACCKK--A-KFS-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Petunia hybrida</i> | PhD2 | ----G-TCKAECTPT-EGCINKAKCVKCKAQP--E-KFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Petunia inflata</i> | PPT | ----R-TCESQSHRF-HCECVRESNGASVCQT--E-GFI-GENCRA--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Capsicum annuum</i> | j1-1 | ----K-ICEALSGNF-KELCLSSRDGNVCRN--E-GFT-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Capsicum annuum</i> | j1-2 | ----R-TCESQSHRF-KELCFKSNQGSVCHT--E-GFN-GEHCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Solanum tuberosum</i> | p322 | ----R-HOESLSHRF-KFCFTRDSNGASVCET--E-RFS-GENCHG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Glycine max</i> | SE60 | ----R-VCESQSHGF-HELCNRDHNGALVCRN--E-GFS-GERCRK--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Vigna unguiculata</i> | 10kDa | ----K-TOENLVDVY-RFCFTTGSDDHCKN-KE-HLL-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Vigna unguiculata</i> | Cp-thionin-1 | ----R-VCESQSHGF-KGACTGDHNGALVCRN--E-GFS-GENCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Vigna unguiculata</i> | Cp-thionin-2 | ----K-TOMTKKEG--GRCLIDTTHCAHSCRK--Y-GYM-GERCQG--I---TRRCYCLLNC- |
| <i>Vigna radiata</i> | Vrd2 | ----K-TOENLANTY-RFCFTTGSDDHCKN-KE-HLR-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Pisum sativum</i> | DRR230-a | ----N-TCENLAGSY-KGVCFG--GDRHCRT-QE-GAI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Pisum sativum</i> | DRR230-b | ----N-TCENLADTY-RVCFCTNASDDHCKN-KE-HLI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Pisum sativum</i> | Psd1 | ----K-TCENLADTY-RVCFCTNASDDHCKN-KE-HLI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Pisum sativum</i> | Psd2 | ----K-TOENLADTY-RVCFCTNASDDHCKN-KE-HLI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Medicago sativa</i> | alfAFP | ----R-TCENLADTY-RVCFCTNASDDHCKN-KE-HLI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Medicago sativa</i> | MtDef1 | ----K-TOENLADTY-RVCFCTNASDDHCKN-KE-HLI-SECRD--D---FRWCCTKPK- |
| <i>Medicago truncatula</i> | MtDef4 | ----R-TCESQSHGF-KGACTGDHNGALVCRN--E-GFS-GERCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Sinapis alba</i> | M1 | ----K-LCERPSGTF-SEVCGNNAKNGCIN-LE-KAR-HGSONY--VF-PAHRCIOYFPC- |
| <i>Sinapis alba</i> | M2A | ----K-LCERPSGTF-SEVCGNNAKNGCIN-LE-KAR-HGSONY--VF-PAHRCIOYFPC- |
| <i>Sinapis alba</i> | M2B | Q---K-LCERPSGTF-SEVCGNNAKNGCIN-LE-KSR-HGSONI--PF-PSNRCIOYFPC- |
| <i>Raphanus sativus</i> | Rs-AFP1 | Q---K-LCERPSGTF-SEVCGNNAKNGCIN-LE-KAR-HGSONY--VF-PAHRCIOYFPC- |
| <i>Raphanus sativus</i> | Rs-AFP2 | Q---K-LCERPSGTF-SEVCGNNAKNGCIN-LE-KAR-HGSONY--VF-PAHRCIOYFPC- |
| <i>Artemisia vulgaris</i> | Art v 1 | ----K-LOEKTSTY-SEKCDN-KKGDKKIE-WE-KAQ-HEACHK--REAGKESCFYFPC- |
| <i>Aesculus hippocastanum</i> | Ah-AMP1 | ----L-ONERPSTWSENGNTAHGDKCQDWEK--E-ASHGACHK--ENHWKCFYFPC- |
| <i>Heuchera sanguinea</i> | Hs-AFP1 | ----K-LODVPSTY-SEHCGSSSKGQCKD-RE-HFAYGACHY--QF-PSVWCFYFPC- |
| <i>Dahlia merckii</i> | Dm-AMP1 | ----E-LCEKASKTY-SENCGNTGHDNCKS-WE-GAA-HEACHV--RN-GKHGCFYFPC- |
| <i>Clitoria ternatea</i> | Ct-AMP1 | ----N-LOERASLTY-TEGCGNTGHDNCKS-WE-SAK-HEACHK--RG--NHWKCFYFPC- |
| <i>Picea abies</i> | SPI1 | ----R-TCKTPSGKF-KEVCASRNKKNVQQT--E-GFP-SECDPHVA--NRRKCYCKPK- |
| <i>Helianthus annuus</i> | SD2 | ----R-TCESQSHKF-KETCLSDTNGANVCHS--E-RFS-GERCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Hordeum vulgare</i> | γ1-H | ----R-ICRRRSAGF-KCECVSNKNAQVCMQ--E-GWG-GENCDG--F---LRRCKCMRRK- |
| <i>Triticum aestivum</i> | Tad1 | ----R-TCESQSHKF-KETCLSDTNGANVCHS--E-RFS-GERCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Sorghum bicolor</i> | SIa1 | ----R-VOMGKQHH-SFECISDRICSNKCVK-EEGGWT-ACYOHL--EYRCKQKAC- |
| <i>Vicia faba</i> | Fabatin-1 | LL--G-RCKVKSNTF-NEFCLTDTHGSTVCRG--E-GYK-GEICRG--L---RRRCMCL--C- |
| <i>Vicia faba</i> | Fabatin-2 | LL--G-RCKVKSNTF-NEFCLTDTHGSTVCRG--E-GYK-GEICRG--L---RRRCMCL--C- |
| <i>Beta vulgaris</i> | AX1 | ----A-ICKKPSKF-KCACGRDADCEKACDQ--E-NWP-GEVQVP--F---LRCEQRRC- |
| <i>Beta vulgaris</i> | AX2 | ----A-TCKAECTPT-DSVGINKKKQVACCKK--A-KFS-DEHCSK--I---LRRGLCTKPK- |
| <i>Spinacia oleracea</i> | So-D2 | GIFSSR-KCKTPSKTF-KFCFTRDSNGASVCET--E-RFS-GENCHG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Elaeis guineensis</i> | EGAD1 | ----R-TCESQSHKF-KETCLSDTNGANVCHS--E-RFS-GERCRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Prunus persica</i> | Ppdfn1 | ----R-TCESQSHRF-KCECVSEKNGASVCET--E-GFS-GEICRG--F---RRRCFCTKPK- |
| <i>Pyrus pyrifolia</i> | pdn-1 | ----R-TCESQSHRF-KCECVSEKNGASVCET--E-GFS-GEICRG--F---RRRCFCTKPK- |
| Secuencia consenso | | C s a g C C C e G C C C C |

Figura 2. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de defensinas maduras de distintas plantas. La secuencia N terminal así como la C terminal en los casos correspondientes, se omitieron. El alineamiento se realizó con el servidor T-coffee y fue editado con el programa GeneDoc. Se indican cuatro niveles de conservación para los residuos: 100% de conservación con fondo negro; 80% de conservación con fondo gris y letra blanca; 60% de conservación con fondo gris y letra negra; y menor al 60% de conservación con fondo blanco. Los residuos cisteína que se encuentran conservados en todas las secuencias se muestran en la secuencia consenso, junto con un residuo de serina (s), un residuo aromático (a), dos glicinas (g y G) y un residuo de glutamato (e) que se encuentran conservados en la mayoría de las secuencias.

Además de las cisteínas (de seis a ocho), los residuos conservados entre las secuencias de defensinas comprenden dos glicinas en las posiciones 13 y 34, un residuo aromático en la posición 11 y un glutamato en la posición 29— numeración relativa a la defensina Rs-AFP1 de *Raphanus sativus* (Broekaert et al. 1995).

Estas proteínas forman una estructura característica conocida como motivo α/β estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$). Este motivo es una expansión de uno más pequeño conocido como α -hélice estabilizada por cisteína (CSH), propuesto por primera vez por Kobayashi et al. en 1991, en el cual un par de cisteínas localizadas en la α -hélice y separadas por tres aminoácidos (CXXXC) forman dos puentes disulfuro con un segundo par de cisteínas ubicadas en una hoja β y separadas por un aminoácido (CXC). El motivo CS $\alpha\beta$ incluye dos cisteínas adicionales que forman un tercer puente disulfuro. En las defensinas de plantas, aunque no en todas, existe un cuarto enlace disulfuro entre cisteínas ubicadas por fuera del motivo CS $\alpha\beta$ que junta las regiones N y C terminal de la proteína para crear una proteína pseudo-cíclica (Lay & Anderson 2005).

En los últimos años se han desarrollado estudios estructurales de cristalografía y de resonancia magnética nuclear (NMR) para caracterizar a diversas defensinas. Entre los péptidos con actividad antifúngica cuyas estructuras han sido elucidadas se incluyen las defensinas de *Nicotiana glauca* (NaD1), *Pachyrrhizus erosus* (SPE10), *Petunia hybrida* (PhD1), *Pisum sativum* (Psd1), *Raphanus sativus* (Rs-AFP1), y *Saccharum officinarum* (Sd5) (Lacerda et al. 2014).

Las defensinas vegetales exhiben un motivo conservado denominado γ -core. Este motivo conecta dos hojas β antiparalelas, comprende una región de giro interpuesta y puede ser representado de la siguiente manera: NH₂...[X₁₋₃]-[GXC]-[X₃₋₉]-[C]...COOH. Se ha descrito que este motivo es importante para la actividad antimicrobiana que exhiben estos péptidos, no sólo por su alto contenido de cisteína sino especialmente por la presencia de residuos cargados positivamente en la región de giro (Yount & Yeaman 2004). En el caso de las defensinas MsDef1 de *Medicago sativa* y MtDef4 de *Medicago truncatula*,

se demostró que este motivo es sumamente importante en relación con su actividad antifúngica. El γ -core de la defensina MtDef4 resultó imprescindible para inhibir el crecimiento de una cepa de *F. graminearum*, mientras que el γ -core de MsDef1 posee aminoácidos involucrados en la ramificación de las hifas (Sagaram et al. 2011). Por otra parte, la defensina RsAFP2 (de *Raphanus sativus*) presenta siete de los diez aminoácidos esenciales para su actividad antifúngica localizados dentro de este motivo (Van der Weerden & Anderson 2013).

1.3.3.3 Clasificación

Una de las primeras clasificaciones de defensinas vegetales fue propuesta en 1995 por Broekaert *et al.* y planteó la división en dos grupos según el efecto morfogénico causado sobre hifas de hongos tratadas con estas proteínas. Las defensinas “morfogénicas” causan una reducción en la elongación de las hifas con un aumento concomitante de la ramificación de las mismas. Dentro de este grupo, se pueden mencionar las defensinas de las familias Brassicaceae (que incluye a Rs-AFP1 y Rs-AFP2 de *Raphanus sativus*) y Saxifragaceae (incluye a Hs-AFP1 de semillas de *Heuchera sanguinea*). Por otro lado, las llamadas defensinas “no morfogénicas” reducen el crecimiento de las hifas sin inducir una distorsión morfológica marcada. En este grupo se pueden mencionar las defensinas de las familias Asteraceae (como Dm-AMP1 de semillas de *Dahlia merckii*), Fabaceae (como Ct-AMP1 de semillas de *Clitoria ternatea*) e Hippocastanaceae (como Ah-AMP1 de semillas de *Aesculus hippocastanum*). Estas dos clases de defensinas también difieren con respecto a su espectro de actividad antifúngica (Broekaert et al. 1995).

Esta clasificación fue realizada teniendo en cuenta sólo 12 secuencias disponibles en aquel entonces y sólo se basó en características relacionadas con la actividad antifúngica con lo cual no es representativa de otras actividades identificadas en defensinas. En la clasificación propuesta por Van der Weerden et al. 2013, se agrupan estas proteínas en función de un análisis de 139 secuencias utilizadas para construir un árbol filogenético. Se distinguen entonces 18 grupos

(Figura 3) basados en dicho análisis filogenético (Van der Weerden & Anderson 2013).

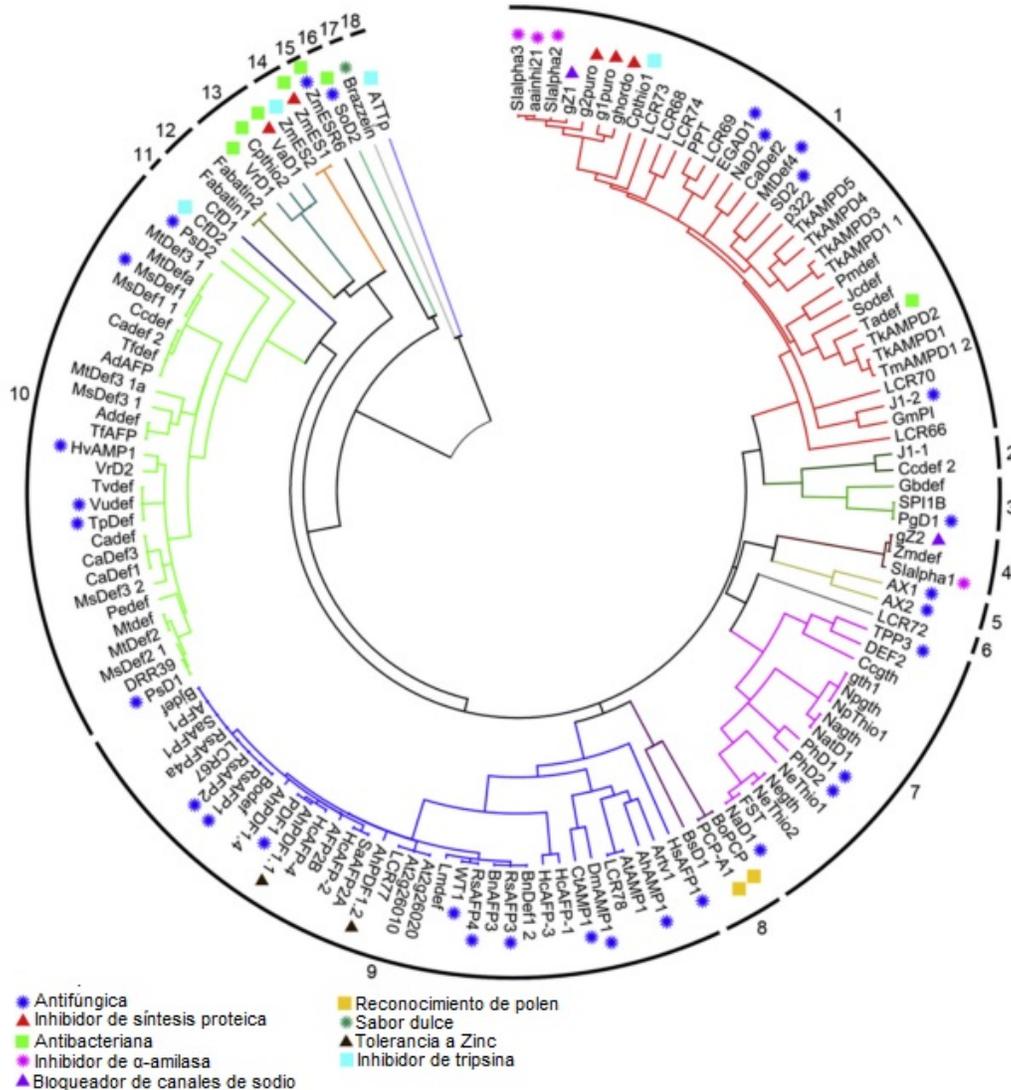


Figura 3: Clasificación de defensinas vegetales en 18 grupos, propuesta por Van der Weerden *et al.* 2013. Se muestra un árbol filogenético circular, las ramas del mismo están coloreadas para representar a los distintos grupos que se muestran en el círculo más externo. Las funciones conocidas de péptidos individuales se indican con distintos íconos, según su actividad (Van der Weerden & Anderson 2013).

También es posible agrupar a las defensinas de plantas en dos clases, en función de la estructura de las proteínas precursoras de las que derivan. En la primera clase (que agrupa la mayor cantidad de defensinas) la proteína precursora se compone de una secuencia señal de retículo endoplásmico (o péptido señal) y el dominio defensina maduro. Estas proteínas son secretadas y no presentan

señales obvias de modificación postraduccional o localización subcelular (Figura 4A).

En la segunda clase (Figura 4B) se agrupa a las defensinas que son producidas como precursores más largos y poseen un prodominio C terminal de aproximadamente 33 aminoácidos, que es removido proteolíticamente en la maduración del péptido. Estas defensinas sólo fueron encontradas en especies de la familia Solanaceae (por ejemplo NaD1 de *Nicotiana alata* y PhD1 y PhD2 de *Petunia hybrida*), donde son expresadas en forma constitutiva en tejidos florales y en futos (Lay & Anderson 2005).

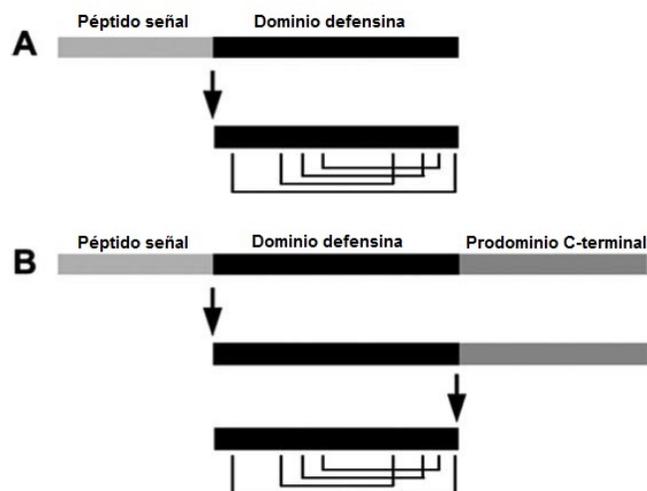


Figura 4. Dos clases de defensinas vegetales.

A. Las defensinas son producidas con una secuencia señal de retículo endoplásmico (o péptido señal) además de contar con el dominio defensina.

B. En algunos casos, como en las solanáceas, las defensinas se producen con un prodominio C-terminal adicional (Lay & Anderson 2005).

La presencia de una secuencia señal en el extremo N terminal sugiere que estas proteínas (ambas clases) son secretadas (Thomma et al. 2002). El prodominio C terminal, por su parte, posee un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y ácidos que coincide con otros determinantes de la localización vacuolar en plantas. Varias hipótesis han sido propuestas para explicar su función, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: (i) que actúa como una secuencia de localización subcelular con lo cual es importante para el tráfico subcelular normal y para el procesamiento proteolítico post-traduccional; (ii) que puede actuar como una chaperona intramolecular, interviniendo en el proceso de

maduración de la defensina; (iii) que puede actuar previniendo interacciones deletéreas entre defensinas y otras proteínas celulares o lípidos de membrana durante la translocación a través de la vía secretoria y (iv) que puede producir un efecto citoprotector antes de que la defensina sea secretada (Lay & Anderson 2005).

1.3.3.4 Mecanismos de acción

Existen dos hipótesis principales que intentan explicar el mecanismo de acción de las defensinas antimicrobianas: el modelo de barril-bastón y el modelo de alfombra. En ambos modelos, se considera que las defensinas interactúan con moléculas cargadas negativamente presentes en las membranas celulares de los patógenos, provocando un aumento en su permeabilización (Lacerda et al. 2014).

Según el modelo de barril-bastón (Figura 5), las α -hélices de los péptidos se agrupan en la membrana celular de manera que dejan un lumen central, lo que se asemeja a un barril compuesto por las hélices como bastones. Las regiones hidrofóbicas interactúan con la región lipídica de la bicapa y las regiones hidrofílicas forman la parte interior del poro.

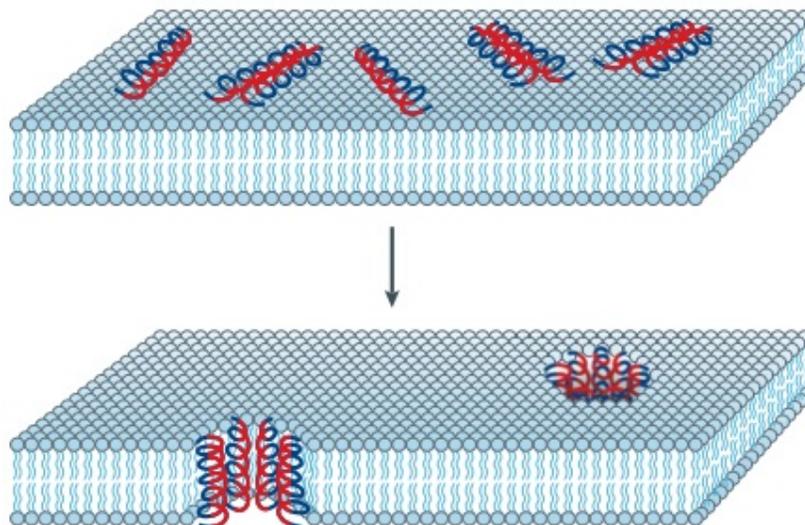


Figura 5. Modelo de barril-bastón. Según este modelo, los péptidos antimicrobianos se insertan en la bicapa fosfolipídica de manera que las regiones hidrofóbicas (en color azul) interactúan con la región lipídica de la membrana mientras que las regiones hidrofílicas (en color rojo) del péptido forman el interior del poro (Brogden 2005).

Según el modelo de alfombra (Figura 6), los péptidos antimicrobianos se

acumulan sobre la membrana celular. Los péptidos son electrostáticamente atraídos a los grupos aniónicos de los fosfolípidos en numerosos sitios, cubriendo la superficie de la membrana como una alfombra. A altas concentraciones de péptido, éstos desestabilizan la bicapa, tal como lo hace un detergente, llevando eventualmente a la formación de micelas.

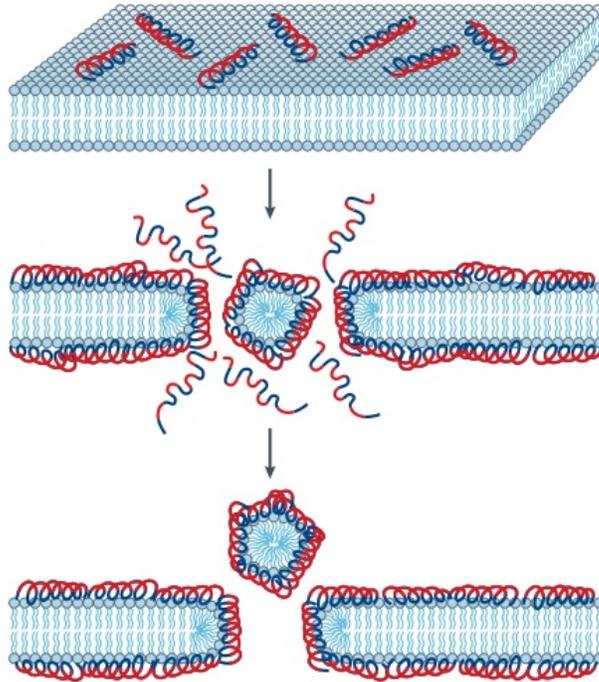


Figura 6. Modelo de alfombra. Los péptidos desestabilizan la membrana, orientándose en forma paralela a la misma cubriendo toda la superficie como una alfombra. Las regiones hidrofóbicas de los péptidos se muestran en azul, mientras que las hidrofílicas se indican en rojo (Brogden 2005).

1.4 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway

La tecnología Gateway® es un método de clonación universal basado en la recombinación sitio específica del bacteriófago *lambda*. El método proporciona una manera rápida y altamente eficiente de transferir secuencias de ADN en múltiples vectores para la expresión y análisis funcional de proteínas, logrando que se mantenga la orientación y marco de lectura (Hartley et al. 2000). El alto rendimiento del método de clonación se basa en las propiedades de recombinación sitio específica del bacteriófago *lambda*. Este sistema facilita la integración del cromosoma de *lambda* en el cromosoma de *E. coli* y permite el intercambio entre las vías lítica y lisogénica (Ptashne 1992). En el sistema

Gateway®, los componentes del sistema de recombinación de *lambda* fueron modificados con el fin de mejorar la especificidad y eficiencia de la recombinación.

La recombinación basada en el sistema *lambda* incluye dos componentes principales:

- i. La recombinación entre secuencias de ADN (sitios *att*).
- ii. Las proteínas que median la reacción (mezcla enzimática *Clonase*™).

La integración de *lambda* en el cromosoma de *E. coli* ocurre a través de la recombinación intermolecular de ADN que es mediado por una mezcla de proteínas codificadas por *lambda* y *E.coli*. A continuación se detallan las características de la recombinación *lambda*:

- ❖ La recombinación ocurre entre sitios específicos de unión (sitios *att*) que se encuentran en las moléculas de ADN que participan de la misma.
- ❖ La recombinación es conservativa (es decir, no hay ganancia ni pérdida de nucleótidos) y no requiere de síntesis de ADN. Los segmentos de ADN que flanquean los sitios de recombinación se conmutan de manera que los sitios *att* son secuencias híbridas que se componen de secuencias donadas por cada vector parental. Por ejemplo, los sitios *attL* se componen de secuencias de sitios *attB* y *attP*.
- ❖ El intercambio de hebras ocurre dentro de una región *core* que es común a todos los sitios *att*.
- ❖ La recombinación puede ocurrir entre moléculas de ADN de cualquier topología (superenrollado, lineal o relajado), aunque la eficiencia varía.

Tal como se mencionó previamente, la recombinación *lambda* ocurre entre sitios específicos de unión (sitios *att*): *attB* en el cromosoma de *E. coli* y *attP* en el cromosoma de *lambda*. Los sitios *att* constituyen el sitio de unión de las proteínas de recombinación y han sido bien caracterizados (Weisberg & Landy 1983). Luego de la integración de *lambda*, la recombinación se produce entre los sitios *attB* y *attP* para dar lugar a los sitios *attL* y *attR*. La recombinación ocurre entre las regiones centrales de 15 pb homólogas en los dos sitios, pero se requieren secuencias circundantes, ya que contienen los sitios de unión para las proteínas de recombinación (Landy 1989).

La reacción de recombinación es catalizada por una mezcla de enzimas. Las proteínas de recombinación involucradas en la reacción difieren dependiendo de si el bacteriófago utiliza la vía lítica o la vía lisogénica. Esto se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1: Descripción de las proteínas involucradas en las vías lítica y lisogénica del bacteriófago *lambda*.

| Vía | Reacción | Catalizada por |
|------------|------------------------------|-----------------------------|
| Lisogénica | attB x attP ---> attL x attR | BP Clonase™ (Int, IHF) |
| Lítica | attL x attR ---> attB x attP | LR Clonase™ (Int, Xis, IHF) |

La vía lisogénica es catalizada por la integrasa de *lambda* (Int) y el factor de integración de huésped de *E. coli* (IHF) que constituyen la mezcla BP Clonase™. La vía lítica, en cambio, es catalizada por las proteínas integrasa (Int) y escisionasa (Xis) y el factor de integración de huésped (IHF) de *E. coli*, que constituyen la mezcla LR Clonase™.

A continuación se explican en detalle cada una de las reacciones de recombinación involucradas.

Reacción BP:

Facilita la recombinación de un sustrato conteniendo los sitios *attB* (*attB*-producto de PCR) con un sustrato conteniendo los sitios *attP* (vector donador) para crear un clon de entrada *attL*. Esta reacción es catalizada por la mezcla enzimática BP Clonase™. La Figura 7 muestra un esquema de esta reacción.

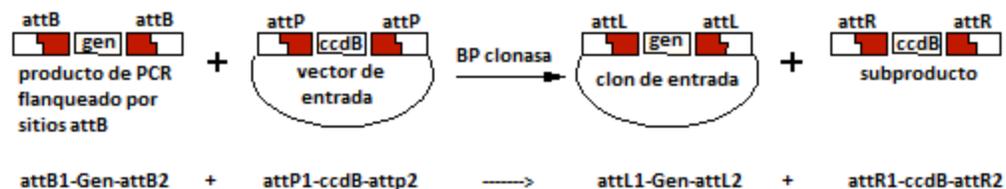


Figura 7: Esquema de la reacción de recombinación BP.

Reacción LR:

Facilita la recombinación de un sustrato conteniendo los sitios *attL* (clon de entrada) con un sustrato *attR* (vector de destino) para crear un clon de expresión

conteniendo los sitios *attB*. Esta reacción es catalizada por la mezcla enzimática LR *Clonase*[™]. La Figura 8 muestra un esquema de esta reacción.

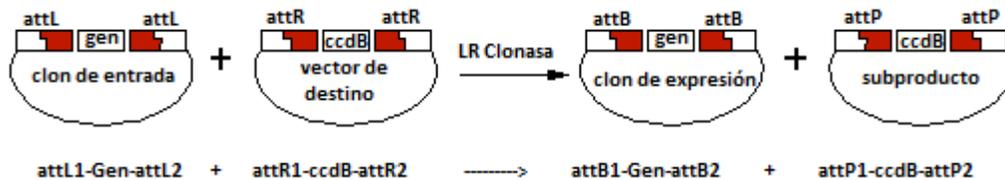


Figura 8: Esquema de la reacción de recombinación LR.

Para permitir la clonación y la selección eficiente de los clones de entrada o expresión, la mayoría de los vectores *Gateway*[®] contienen dos sitios *att* flanqueando un *cassette* que contiene el gen *ccdB* para la selección negativa y el gen de resistencia a Cloranfenicol (*Cm*^R). Luego de la reacción de recombinación BP o LR, este *cassette* es reemplazado por el gen de interés para generar el clon de entrada y expresión, respectivamente.

La proteína CcdB interfiere con la ADN girasa de *E. coli* (Bernard & Couturier 1992), inhibiendo por lo tanto el crecimiento de la mayoría de las cepas *E. coli* (como DH5α o TOP10). Cuando se produce la recombinación, el gen *ccdB* es reemplazado por el gen de interés. Aquellas células que hayan incorporado el vector que lleva el gen *ccdB* no se propagarán. Esto permite obtener una alta eficiencia en la recuperación de los clones deseados. Vale aclarar que debido a los efectos letales de la proteína CcdB, todos los vectores *Gateway*[®] deben ser propagados en cepas *E. coli* que sean resistentes a los efectos de dicha proteína (como la cepa *E. coli ccdB survival*).

CAPÍTULO 2: Objetivos

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

A partir de extractos florales, en el CIProVe hemos demostrado la presencia de proteínas tipo defensina en varias especies de cardos que crecen en la Provincia de Buenos Aires. Una de estas defensinas ha sido clonada a partir de ARNm de pimpollos de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae), la secuencia completa codifica para una proteína con un dominio defensina y un dominio rico en prolina. Para estudiar en detalle el dominio defensina, se planteó en este trabajo su clonación y la obtención de una construcción que posteriormente permita su expresión. Asimismo, a partir de la secuencia aminoacídica del dominio defensina se planteó la realización de un modelado molecular por homología a fin de predecir su estructura terciaria y en función de esta, inferir posibles funciones.

2.1 Objetivos generales

- 1) Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica profunda sobre un tema específico de investigación.
- 2) Obtener adiestramiento en el manejo de distintas técnicas de laboratorio:
 - a. Preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso frecuente.
 - b. Técnicas de biología molecular: reacciones de PCR y de digestión enzimática, preparación de células competentes químicas, transformación de ADN, etc.
 - c. Técnicas de microbiología.
 - d. Utilización de herramientas bioinformáticas.
- 3) Lograr la integración y adaptación a un grupo de trabajo de investigación.
- 4) Adquirir criterio experimental que permita optimizar distintos tipos de ensayos.
- 5) Resolver los problemas teóricos o experimentales que se presenten durante el desarrollo de la investigación.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Clonar el dominio defensina a partir de construcciones disponibles en el laboratorio (*pDONR222-DefSm1* y *pTZ57R/T-DefSm1*).
- 2) Obtener una construcción que permita la posterior expresión del dominio defensina.
- 3) Realizar el modelado molecular por homología a partir de la secuencia aminoacídica del dominio defensina.

CAPÍTULO 3: Materiales y Métodos

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Cepas bacterianas

❖ *Escherichia coli*:

DH5 α : F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17* (rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1* λ -T1R. Utilizada en clonados convencionales.

TOP10: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*. Utilizada en clonados que requieren alta eficiencia de transformación.

ccdB Survival: (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG tonA::P_{trc}-ccdA*). Utilizada para amplificar los vectores Gateway que contienen el gen tóxico *ccdB*.

3.1.2 Medios de cultivo

- ❖ *Medio Luria-Bertani (LB)*: Triptona 10 g/L (Biokar); Extracto de levadura 5 g/L (Britania); NaCl 10 g/L (Biopack). Para lograr medios de cultivo sólido se adicionó 20 g/L de agar CHEMIT.
- ❖ *Medio SOC*: Bactotriptona 20g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 1,86 g/L; MgCl₂ 2,03 g/L; MgSO₄ 1,2 g/L; Glucosa 3,6 g/L (Sigma). Para lograr medios de cultivo sólido se adicionó 20 g/L de agar.

3.1.3 Buffers

- ❖ *Buffer TAE*: Tris 40 mM pH 7,6 (Biopack); Ácido acético 20 mM (Cicarelli); EDTA 1mM (Invitrogen). Utilizado para preparar geles de agarosa y como buffer de corrida en las electroforesis de DNA.
- ❖ *Buffer TE*: Tris-Cl 10 mM pH 7,5; 1mM EDTA. Utilizado para resuspender cebadores.

- ❖ *Buffer TBF I*: Cloruro de Rubidio 100 mM (Sigma); Cloruro de Manganeso 50 mM (Sigma); Acetato de Potasio 30 mM (Sigma); Cloruro de Calcio 10 mM (Cicarelli); Glicerol 15%; pH 5,8. Utilizado en la preparación de células competentes químicas.
- ❖ *Buffer TBF II*: MOPS 10 mM (Sigma); Cloruro de Rubidio 10 mM; Cloruro de Calcio 75 mM; Glicerol 15%; pH 6,5. Utilizado en la preparación de células competentes químicas.

3.1.4 Soluciones de antibiótico

Para la selección de bacterias, la concentración de stock y la concentración a la que se llevaron los antibióticos en el medio de crecimiento (ya sea líquido o sólido) se detalla en la tabla 2.

Tabla 2: Concentraciones stock y finales para los distintos antibióticos utilizados

| Nombre | Stock (mg/mL) | Concentración final para E.Coli (µg/mL) |
|------------------------|---------------|---|
| Ampicilina (Bagó) | 200 | 100 |
| Kanamicina (Sigma) | 100 | 50 |
| Estreptomicina (Sigma) | 100 | 25-100 |
| Cloranfenicol (Sigma) | 100 | 30 |

3.1.5 Vectores plasmídicos

- ❖ *Vectores utilizados como moldes de DNA*: la secuencia codificante del dominio defensina fue subclonado a partir de los plásmidos *pDONR222-DefSm1* y *pTZ57R/T-DefSm1* que contienen la secuencia del precursor de una proteína con un dominio defensina y un dominio rico en prolina.
- ❖ *Vectores de clonado*:
pDONR 221 (Invitrogen): es un vector del sistema de clonado de tecnología Gateway® que permite generar clones de entrada con el gen de interés flanqueado por sitios *attL* luego de la recombinación BP con el producto de PCR con los sitios *attB*. El mapa de este vector se muestra en la sección Material Suplementario 6.1 (Capítulo 6).
- ❖ *Vectores de expresión*:

p0GWA (Busso et al. 2005): este vector de tecnología *Gateway*[®] (ver sección Material Suplementario 6.2 en el Capítulo 6) incluye los sitios *attR* y permite generar clones de expresión luego de la recombinación con el vector pDONR221 (con el gen de interés flanqueado por sitios *attL*) utilizando la mezcla enzimática *Gateway*[®] LR Clonase™ II (Invitrogen).

3.1.6 Cebadores

Se utilizaron distintos oligonucleótidos para las reacciones de PCR:

- ❖ *TP640 (directo) y L641R (reverso)*: se emplearon para amplificar el dominio defensina (a partir de las construcciones *pDONR222-DefSm1* y *pTZ5R/T-DefSm1*) y agregar los sitios *attB1* (incluido en el primer TP640) y *attB2* (incluido en el primer L641R). El producto de PCR se empleó posteriormente para la recombinación con el vector pDONR221. Además, estos cebadores también se emplearon para chequear la presencia del inserto luego de la reacción de recombinación LR, ya que en la misma se regeneran los sitios *attB*.
- ❖ *L2F (directo) Y L4R (reverso)*: fueron utilizados para chequear la presencia del dominio defensina en el vector pDONR221. El primer L2F se encuentra próximo al sitio *attL1* y el L4R se encuentra próximo al sitio *attL2*.

En la tabla 3 se muestran las secuencias nucleotídicas de cada uno de los cebadores empleados.

Tabla 3: Secuencias de los cebadores utilizados y su denominación.

| Denominación | Secuencia Nucleotídica |
|--------------|--|
| TP640 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCACTCCAAAATTATGTGAAAAGC-3' |
| L641R | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTGGAATAGTCGAAGTAGC-3' |
| L2F | 5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGG-3' |
| L4R | 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAACAC-3' |

3.1.7 Enzimas recombinantes

- ❖ *DNA polimerasa GoTaq (Promega)*: esta enzima posee además actividad transferasa terminal 3'→5' incorporando en los extremos de las secuencias amplificadas bases nucleótidos de timidina adicionales.

- ❖ *DNA polimerasa Platinum High Fidelity (Invitrogen)*: es una mezcla de enzimas. Contiene Taq DNA polimerasa, polimerasa de *Pyrococcus species* GB-D y anticuerpo Taq Platinum. Las polimerasas de *Pyrococcus* poseen actividad exonucleasa 3'→5' (proofreading) con lo cual aumenta la fidelidad seis veces en relación con la Taq convencional. Presenta incorporada la tecnología 'hot start' gracias a la presencia del anticuerpo que forma un complejo con la enzima que inhibe la actividad polimerasa a temperatura ambiente. La actividad se recupera luego de la desnaturalización inicial a 94 °C, aumentando la especificidad, sensibilidad y rendimiento.
- ❖ *Enzimas de restricción*: se utilizó la enzima Bsp1407I (isoesquisómero de BsrGI, Thermo Scientific).

3.2 Herramientas Bioinformáticas

3.2.1 Herramientas generales

- ❖ *OligoAnalyzer 3.1* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>): Servidor empleado para calcular las temperaturas de *melting* de los oligonucleótidos y el contenido de guanina-citocina. Además, permite evaluar la formación de *hairpins* y dímeros de *primers*.
- ❖ *RestrictionMapper versión 3* (<http://www.restrictionmapper.org>): Servidor utilizado para llevar a cabo la digestión virtual a fin de establecer los patrones de restricción esperados.
- ❖ *T-coffee* (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>): Servidor utilizado para realizar alineamientos múltiples (Di Tommaso et al. 2011).
- ❖ *BioEdit Sequence Alignment Editor (copyright© 1997-2013 Tom Hall)*: Programa que permite analizar y editar secuencias de ADN.
- ❖ *PlasMapper versión 2.0* (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>): Servidor que permite generar mapas de vectores plasmídicos empleando sólo una secuencia de ADN como *input* (Dong et al. 2004).

3.2.2 Herramientas empleadas para el modelado molecular por homología

- ❖ *HHPred* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>): Servidor utilizado para realizar la asignación de plegamiento (*fold assignment*). Permite la detección de proteínas homólogas remotas y la predicción estructural a partir de una secuencia problema empleando un método de comparación HMM-HMM (Söding et al. 2005).
- ❖ *ClustalW* (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>): Servidor empleado para realizar el alineamiento entre la secuencia molde y la secuencia a modelar.
- ❖ *Gene Doc Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility* (versión 2.7.000): Este programa fue utilizado para analizar y editar alineamientos.
- ❖ *Modeller, versión 9.14* (copyright© 1989-2015 Andrej Šali): Modelado por homología o comparativo de proteínas, utilizado para modelar una proteína cuya estructura molecular no es conocida empleando como molde una proteína homóloga cuya estructura ya ha sido resuelta (Šali & L. 1993).
- ❖ *ProSA-web* (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>): Servidor *on line* que permite la evaluación energética de modelos tridimensionales de proteínas (Wiederstein & Sippl 2007).
- ❖ *PROCHECK*: Programa empleado para evaluar la calidad estructural del modelo tridimensional (Laskowski et al. 1993).
- ❖ *ProFunc* (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>): Servidor que permite la identificación de la función bioquímica más probable de una proteína a partir de su estructura tridimensional.

3.3 Metodologías

3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos

El crecimiento de las distintas cepas bacterianas se realizó en medio LB o SOC líquido a 37°C con agitación a 250 rpm en un incubador orbital. Para la

selección y mantenimiento de la presión selectiva de clones recombinantes se añadieron diferentes antibióticos. La concentración a la que se llevaron los antibióticos en el medio de crecimiento ya sea líquido o sólido se detalla en la tabla 1.

Para el repique en medio líquido se tomaron tubos de 15 mL estériles. Se colocaron 5 mL de medio con el antibiótico de selección correspondiente. Se picaron tres o cuatro colonias de cada placa y se colocaron en sendos tubos con el rótulo correspondiente. Se incubaron en agitador orbital a 37°C y 250-280 rpm.

El mantenimiento de las distintas cepas bacterianas y clones recombinantes se realizó en medio LB o SOC, en presencia de glicerol 15%, manteniéndose a -80°C.

3.3.2 Obtención de células competentes químicas

3.3.2.1 Método de cloruro de calcio

Para la preparación de bacterias competentes se partió de un stock glicerolado, se realizaron estrías en una placa LB sin antibiótico. Se dejó crecer a 37°C ON. Se repicaron dos colonias en tubos Falcon con 5 ml de LB. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C y con agitación (250-280 rpm). Se tomaron 500 µl del cultivo saturado y se realizó una dilución del mismo 1:200 en medio LB fresco en un erlenmeyer. Se incubó a 37°C con agitación durante dos horas aproximadamente hasta alcanzar una DO (600nm) de 0,6. Se dejó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de CaCl₂ 0,05 m (estéril y enfriado a 4°C). Se homogeneizó usando vortex y se dejó reposar 10 minutos en baño de hielo. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ (estéril y enfriado a 4°C). Se agregaron 0,8 ml de glicerol y se homogeneizó usando vortex. Finalmente se fraccionó de a 100 µl en eppendorfs estériles y se almacenó inmediatamente a -80°C.

3.3.2.2 Método de cloruro de rubidio

Para la preparación de bacterias competentes se partió de un stock glicerolado, se realizaron estrías en una placa LB sin antibiótico. Se dejó crecer a 37°C ON. Se repicaron dos colonias en tubos Falcon con 5 ml de LB. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C y con agitación (250-280 rpm). Se tomaron 500 µl del cultivo saturado y se realizó una dilución del mismo 1:100 en medio LB fresco en un erlenmeyer. Se incubó a 37°C con agitación durante dos horas aproximadamente hasta alcanzar una DO(600nm) de 0,6. Se dejó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos y 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de buffer TBF I. Se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de buffer TBF II y se incubó en hielo durante 60 minutos. Finalmente se fraccionó de a 50 µl en eppendorfs estériles y se almacenó inmediatamente a -80°C.

3.3.3 Transformación por shock térmico

Para realizar la transformación por shock térmico se descongelaron las cepas a utilizar lentamente en baño de hielo, se adicionaron 25 ng de DNA (o 1 µl de plásmido obtenido por minipreparación) a 100 o 50 µl de bacterias competentes. Se adicionó 1 µl de DMSO y se dejó en hielo por 30 minutos. Luego se realizó un shock térmico durante 45 segundos a 42°C y rápidamente se pasó al baño de hielo por 5 minutos más. A la mezcla de bacterias con el plásmido se le adicionó 250 µl de LB o SOC fresco a temperatura ambiente (sin antibióticos) y se incubó a 37°C con agitación durante dos horas a 220-250 rpm. Luego fue volcado sobre una placa Agar-LB/SOC suplementado con el antibiótico de selección correspondiente y plaqueado con espátula de Drigalsky. Luego de incubar toda la noche a 37°C se pudieron obtener las colonias transformadas.

3.3.4 Extracción de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico en forma de minipreparaciones con elevado grado de pureza y calidad para los procedimientos de biología molecular,

se realizó mediante el método de lisis alcalina con unión a sílica o el uso del kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

3.3.4.1 Método de lisis alcalina con unión a sílica

Luego de la centrifugación del cultivo se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de una solución 50mM Tris, 10 mM EDTA y pH 8,0. Se agitó con vortex y se añadió 200 µl de una mezcla de 0,2 M de NaOH y SDS 1% (preparada en el momento), se mezcló suavemente por inversión y se agregaron 200 µl de solución de KAc 3 M con pH 5,5. Se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se procedió con la unión del DNA a la sílica. Para esto se agregaron 10 µl de suspensión de sílica y se mezcló. Se sedimentó la sílica por centrifugación, 10 segundos al máximo en microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar tres lavados con 300 µl de una solución 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM EDTA y 50% Etanol. Luego de los lavados, se centrifugó a máxima velocidad por 10 segundos para remover el líquido residual y se secó al aire para eliminar el etanol residual. Se resuspendió la sílica en 40 µl de agua mili Q, se mezcló con vortex y se calentó por 5 minutos a 65 °C. Finalmente, se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad y se tomó el sobrenadante conteniendo en ADN.

3.3.4.2 Kit comercial

El kit utilizado, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), combina la liberación del ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, con la unión selectiva del mismo a columnas de fibra de vidrio en las condiciones usadas en el procedimiento. Para la obtención de las minipreparaciones se partió de un cultivo bacteriano proveniente de una única colonia de transformada siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.5 Reacciones de PCR

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar el dominio defensina a partir de las construcciones *pDONR222-DefSm1* y *pTZ57R/T-DefSm1*. En estas

reacciones se emplearon cebadores cuyas secuencias incluyeron los sitios *attB* para obtener así el dominio defensina flanqueado por dichos sitios, producto que luego se utilizó para la recombinación BP.

También se realizaron reacciones de PCR para chequear la presencia del inserto luego de la recombinación con la mezcla enzimática *Gateway*® BP Clonase™ II (Invitrogen) y luego de la recombinación con la mezcla enzimática *Gateway*® LR Clonase™ II (Invitrogen).

3.3.5.1 Condiciones de amplificación por PCR

Se emplearon las ADN polimerasas termoestables *Platinum High Fidelity* y *GoTaq*, la composición de las mezclas de reacción para cada una de ellas se presentan en la tabla 4 y 5, respectivamente. Las reacciones de PCR con los primers L2F y L4R, se realizaron en un volumen final de 20 μ l. La reacción con los primers TP640 y L641R se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l. Las reacciones de PCR de chequeo o las que se hicieron para poner a punto las condiciones de amplificación se realizaron utilizando la *GoTaq* polimerasa, mientras que las PCR preparativas para la posterior recombinación se hicieron empleando la polimerasa *Platinum High Fidelity*.

Tabla 4: Mezcla de reacción para la polimerasa *Platinum High Fidelity*.

| Polimerasa Platinum High Fidelity | | |
|-----------------------------------|------------|---------------------|
| Componente | Stock | Concentración final |
| Primer TP640 | 10 μ M | 0,2 μ M |
| Primer L641R | 10 μ M | 0,2 μ M |
| Buffer Platinum | 10X | 1X |
| MgSO4 | 50 mM | 2 mM |
| dNTPs | 10 mM | 0,2 mM |
| Enzima | - | 1 U |

Tabla 5: Mezcla de reacción para la polimerasa *GoTaq*

| GoTaq ADN polimerasa | | |
|----------------------|-----------|---------------------|
| Componente | Stock | Concentración final |
| Primer directo L2F | 2 μ M | 0,2 μ M |
| Primer reverso L4R | 2 μ M | 0,2 μ M |
| Buffer | 5X | 1X |
| dNTPs | 10 mM | 0,2 mM |
| Enzima | - | 1,25 U |

Las tablas 6 y 7 muestran el programa de amplificación utilizado para la enzima *Platinum High Fidelity* y *GoTaq*, respectivamente.

Tabla 6: Programa de amplificación para la polimerasa *Platinum High Fidelity*

| Polimerasa Platinum High Fidelity, | | |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Etapa | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Tiempo (minutos) |
| I)Desnaturalización inicial | 94 | 2 |
| 30 ciclos | II) Desnaturalización | 94 |
| | III) Hibridación | 56 |
| | IV) Extensión | 68 |
| | V)Extensión final | 68 |
| | | 10 |

Tabla 7: Programa de amplificación para la polimerasa *GoTaq*.

| GoTaq ADN polimerasa | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Etapa | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Tiempo (minutos) |
| I)Desnaturalización inicial | 95 | 5 |
| 30 ciclos | II) Desnaturalización | 95 |
| | III) Hibridación | 55 |
| | IV) Extensión | 72 |
| | V)Extensión final | 72 |
| | | 10 |

3.3.5.2 Colony-PCR

Para chequear la presencia del dominio defensina en el vector de expresión p0GWA, se realizó una *colony*-PCR con los oligonucleótidos TP640 y L641R, bajo las condiciones descritas en la sección 3.3.5.1. Para realizar este ensayo, se tomaron las colonias deseadas con un *tip* estéril y se transfirieron a tubos conteniendo 50 μ l de agua estéril (una colonia para cada tubo) moviendo suavemente el *tip*. Se llevó a hervir durante 10 minutos y luego se centrifugó a

máxima velocidad durante 5 minutos. Finalmente, se tomaron 5 μ l del sobrenadante para realizar la reacción de PCR.

3.3.6 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA plasmídico, productos de digestión enzimática y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 1% y 2% p/v, según los tamaños de los fragmentos a separar, siendo mayor el porcentaje cuanto más chico es el fragmento, tal como muestra la tabla 8. La agarosa se disolvió en buffer TAE 1X. Se mezclaron 5,0 μ l de la muestra de ADN con 5 μ l de colorante GelRed™ 10.000X (Genbiotech). La electroforesis se llevó a cabo a 80 voltios durante 30-60 minutos. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo con buffer TAE a voltaje constante (80 volts) en un sistema Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad). Los ácidos nucleicos se observaron en un transiluminador (Vilber Lourmat) con luz ultravioleta a 260nm.

Tabla 8: Porcentaje de agarosa recomendado según los tamaños a separar

| Porcentaje (%p/v) agarosa | Rango de tamaños (kb) |
|---------------------------|-----------------------|
| 0,5 | 1 – 30 |
| 0,7 | 0,8 – 12 |
| 1 | 0,5 – 10 |
| 1,2 | 0,4 – 7 |
| 1,5 | 0,2 – 3 |
| 2 | 0,05 – 2 |

3.3.7 Purificación de DNA a partir de gel utilizando un kit comercial

Para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR se utilizó el kit de purificación GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) procediendo según lo recomendado por el fabricante. Se cortaron las bandas del gel de agarosa que poseían los fragmentos relevantes de ADN y se colocaron en un tubo de 1,5 ml adicionando posteriormente el volumen correspondiente de buffer de unión. Las muestras se incubaron a 55°C durante 10 o 15 minutos y luego transfirieron a las columnas de purificación donde fueron sometidas a sucesivos pasos de lavado. Finalmente el ADN fue eluido de la columna con agua bidestilada estéril y

recuperado en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de DNA recuperadas fueron, en todos los casos, almacenadas a -20°C.

3.3.8 Reacción de recombinación BP clonasa

Teniendo en cuenta las construcciones *pDONR222-DefSm1* y *pTZ57R/T-DefSm1* disponibles en el laboratorio, se diseñaron oligonucleótidos a fin de clonar sólo el dominio defensina. En la secuencia de los cebadores se incluyeron los sitios *attB* necesarios para la reacción de recombinación BP. La amplificación por PCR se llevó a cabo según lo explicado en el ítem 3.3.5.1 de esta sección. Luego de la amplificación, los productos obtenidos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) y posteriormente se realizó la purificación de las bandas con el tamaño deseado como se indicó en el ítem 3.3.7 de esta sección.

Se llevó a cabo la reacción de recombinación entre el fragmento de ADN flanqueado por los sitios *attB* (producto de purificación) y el vector pDONR221, que contiene los sitios *attP* para generar el clon de entrada (tabla 9).

Tabla 9: Composición de la mezcla de reacción de la BP Clonasa.

| Componente | Volumen (µl) |
|--------------|--------------|
| Producto PCR | 2,5 |
| pDONR221 | 1,5 |
| BP Clonasa | 1 |

Se mezcló con vortex dos veces brevemente y se incubó la reacción a 25 °C toda la noche. El producto de la recombinación se empleó para transformar células de *E. coli* DH5α competentes. La reacción de recombinación BP se esquematiza en la Figura 9 en la Introducción.

Las colonias positivas se seleccionaron debido a la resistencia del vector a Kanamicina y fueron repicadas en medio líquido. Se realizó la extracción de ADN plasmídico. La presencia del vector con el gen que codifica para el dominio defensina fue confirmado por PCR utilizando cebadores específicos (L2F y L4R) y a través del análisis de restricción con la enzima Bsp1407I (BsrGI). Posteriormente, dos muestras provenientes de clones seleccionados al azar

fueron remitidas al servicio de secuenciación del INTA, para corroborar que el dominio defensina se encontrara en el marco de lectura adecuado.

3.3.9 Reacción de recombinación LR clonasa

El vector pDONR221 conteniendo el gen de interés en el marco de lectura adecuado, se utilizó para recombinar con el vector de expresión p0GWA. Para esto se llevó a cabo la reacción de recombinación con la enzima clonasa LR (tabla 10).

Tabla 10: Composición de la mezcla de reacción de la LR Clonasa

| Componente | Volumen (µl) |
|-------------------------|--------------|
| <i>pDONR221-DefSm1D</i> | 0,5 |
| p0GWA | 3 |
| LR Clonasa | 0,5 |

La mezcla de reacción se mezcló y se incubó a 25° C toda la noche. Luego se agregó 1 µl de Proteinasa K para finalizar la reacción. La mezcla se utilizó para transformar células *E.coli* TOP10 competentes. Las colonias fueron seleccionadas (ampicilina) al azar y fueron repicadas en medio líquido. Un cultivo crecido durante la noche se utilizó para aislar el plásmido. La presencia del vector que contiene el gen que codifica para el dominio defensina fue confirmado por *colony*-PCR utilizando cebadores específicos (TP640 Y L641R). La reacción de recombinación LR se esquematiza en la Figura 10 en la Introducción.

3.3.10 Digestión enzimática

Se llevó a cabo el análisis de restricción para el clon de entrada, a fin de chequear la construcción obtenida. En la reacción de digestión se empleó la enzima Bsp1407I (BsrGI) para chequear la construcción *pDONR221-DefSm1D*. Las tabla 11 muestra la composición de la mezcla de digestión.

Tabla 11: Composición de la mezcla de digestión para la enzima BsrGI

| Componente | Volumen (µl) |
|------------------|--------------|
| Agua | 16,5 |
| Buffer Tango 10X | 2 |
| DNA | 1 |
| Enzima (BsrGI) | 0,5 |

La mezcla se incubó durante 5 horas a 37°C y luego se inactivó la enzima incubando a 65°C por 20 minutos. El producto de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 0,7%.

3.3.11 Modelado molecular por homología del dominio defensiva

3.3.11.1 Construcción del modelo molecular

El modelo tridimensional del dominio defensiva se obtuvo a partir de un método de modelado por homología. Los métodos incluidos dentro de esta categoría se basan en hecho de que aquellas proteínas con un origen común (homólogas) tienden a plegarse en forma similar. Por lo tanto, empleando una proteína homóloga con estructura conocida (molde o *template*) es posible construir modelos tridimensionales utilizando esa información estructural.

Para obtener el modelo tridimensional del dominio defensiva, en primer lugar, se realizó la asignación de plegamiento o *fold assignment* que permite encontrar la proteína homóloga (ya cristalizada) más adecuada para emplear como molde. El *fold assignment* se llevó a cabo empleando el servidor HHPred (Söding et al. 2005) que permite la detección de proteínas homólogas remotas y la predicción estructural a partir de una secuencia problema empleando un método de comparación HMM-HMM. Luego se realizó el alineamiento entre la secuencia del dominio defensiva y el molde con el servidor ClustalW (EMBNET) y se editó con el programa GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility. Este alineamiento, junto con el archivo PDB de la proteína elegida como molde así como también el *script* correspondiente fueron los archivos que se utilizaron como *input* para ejecutar el cálculo con el programa Modeller, versión 9.14 (Šali & L.

1993). Este programa constituye un método de modelado comparativo diseñado para encontrar la estructura más probable de una secuencia determinada, en función de su alineamiento con una proteína homóloga con estructura conocida. El modelo tridimensional se obtiene por satisfacción de restricciones espaciales. El programa toma las distancias entre residuos a partir del *template*, que se complementan con datos estereoquímicos, distancias de enlaces, ángulos dihedros, distancias de interacciones débiles, etc y todos esos datos se combinan para dar una función objetivo (*objective function*). El modelado consiste en optimizar esta *objective function*. El mejor modelo es aquel que viola el menor número de restricciones espaciales y será el que posea el menor valor de *objective function*.

3.3.11.2 Evaluación del modelo obtenido

La calidad del modelo estructural obtenido fue evaluada a través de dos tipos de criterios: energéticos y estructurales/geométricos.

La evaluación energética del modelo se llevó a cabo empleando el servidor ProSA-web (Wiederstein & Sippl 2007), que permitió realizar un análisis global y local. En el caso del análisis global, se comparó la energía del modelo obtenido con la de todas las proteínas ya cristalizadas (a través de un parámetro denominado *Z-score*); mientras que el análisis local permitió evaluar la energía para cada residuo del modelo de la proteína en cuestión. En el caso de tratarse de un buen modelo, deben esperarse valores de energía negativos. También se usó como criterio energético el potencial estadístico DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) llevado a cabo a través del programa Modeller, que es similar a la evaluación local mencionada previamente, ya que permite analizar la energía de cada residuo, siendo un modelo de buena calidad aquel que presenta la mayor cantidad de residuos con un *DOPE score* menor a cero.

La evaluación estructural/geométrica, se realizó a través del programa PROCHECK (Laskowski et al. 1993). Este programa permitió construir el denominado diagrama de Ramachandran. En este diagrama es posible visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) en

los aminoácidos de un polipéptido, que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. Sobre este diagrama, el programa PROCHECK ubica a los residuos de la proteína modelada que estarán en distintas regiones dependiendo la calidad del modelo. Se pueden distinguir cuatro regiones en este diagrama: regiones favorecidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas y no permitidas.

3.3.12 Predicción funcional

El modelo tridimensional obtenido fue cargado en el servidor ProFunc, que permite realizar predicciones en relación con la función de la proteína introducida como *input* en base a métodos de análisis de tipo secuenciales y estructurales. Este servidor combina una serie de métodos de predicción de función proteica y proporciona una presentación simplificada de los resultados, devueltos en un formato fácil de interpretar. ProFunc realiza una evaluación general de los términos funcionales más comunes, empleando los términos GO (*Gene Ontology*), que son términos que permiten caracterizar proteínas en base a tres aspectos: proceso biológico en el que participan (*biological process*), componente celular donde se localiza (*cellular component*) y función molecular (*molecular function*).

Luego de cargar el modelo estructural en formato PDB al servidor, el mismo proporciona una página de resumen general que ilustra los resultados de los distintos métodos utilizados. En la parte superior de la página aparecen los términos GO, que proveen un panorama general de los términos más comunes resultantes de la búsqueda. Aquellos términos que posean un *score* mayor a 10 son los que se consideran significativos y que poseen más probabilidades de ser correctos (Laskowski et al. 2005).

CAPÍTULO 4: Resultados y Discusión

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Diseño experimental

En nuestro laboratorio fue posible clonar previamente el precursor de una defensina a partir de flores de *Silybum marianum* (DefSm1, número de acceso de GenBank: KT207793). La secuencia de 257 aminoácidos comprende el péptido señal, un dominio defensina y un dominio rico en prolina (Figura 9). De acuerdo al cálculo realizado a través de la herramienta *Compute pI/Mw* (ExpASy) la proteína posee una masa molecular estimada de 27 KDa y un pI teórico de 9,76. Sin embargo, el dominio tipo defensina, DefSm1D, es de 54 aminoácidos con una masa molecular de 5,99 KDa y un pI teórico de 8,53.

Con el fin de estudiar en detalle el dominio defensina, este trabajo se orientó hacia la clonación del mismo y la obtención de una construcción que posteriormente se empleará en ensayos de expresión que permitirán caracterizar este péptido y evaluar su actividad. Asimismo se realizó un modelado molecular por homología del dominio defensina para predecir su estructura terciaria y realizar el análisis estructura-función.

En el caso de la clonación, se decidió emplear un sistema de clonado de alta eficiencia como lo es el sistema *Gateway*®. Tal como se describió previamente en la introducción, éste es un método universal de clonado basado en las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago *lambda* que provee una manera rápida y altamente eficiente de transferir secuencias de DNA a múltiples sistemas de vectores para análisis funcional y expresión de proteínas. Para llevar a cabo el clonado en este sistema se generó primero un clon de entrada a partir de una reacción de recombinación (reacción BP) con el vector pDONR221. Se seleccionaron varios clones positivos y la construcción obtenida fue chequeada a través de reacciones de PCR y digestión. Finalmente, se remitieron dos muestras al servicio de secuenciación. A continuación, el clon de entrada fue sometido a una reacción de recombinación (reacción LR) que dio lugar

a la incorporación del inserto en el vector de destino, que en este caso fue el vector de expresión p0GWA. Finalmente, se chequeó esta construcción a partir de ensayos de PCR.

En cuanto al modelado molecular por homología, se empleó el programa Modeller y el modelo tridimensional obtenido fue sometido a distintas evaluaciones (energéticas y estructurales) a fin de analizar su calidad. Asimismo, empleando como *input* el modelo obtenido se realizó un análisis de predicción funcional empleando el servidor ProFunc.

```

atgacaaaaagatcgatttcttactttgcatcttcttttgctcctcttcattcttgggatc
M T K R S I S Y F A F L L L L F I L G I
tcagaggcgggcaagcgactcmetaattatgtgaaaagccaagcaaacatgggcccggg
S E A V Q A T P K L C E K P S K T W S G
aaatgtgatgccgcaaagtgcgacaacaagtgcatacttgggaggggtgcaaccatgga
K C D A A K C D N K C I S W E G A T H G
gcctgtcatttgctgaagccaaatcaagttgcttttgctacttcgactattccaaagac
A C H L R E A K S S C F C Y F D Y S K D
gagaagaaaccacctccaaacataagtgcgccaccacccaaagacaaaaaacaccacc
E K K P P P K H K S P P P K D K K P P P
aaagacaaaaagccacctccaaagacaaatctccacctccacccaaagccgggtctccc
K D K K P P P K D K S P P P P K A G S P
ccacctcctgctgatgggtgggtcatcgccctcctccaaagacgggtcttcccacctcct
P P P A D G G S S P P P K D G S S P P P
gctgacgggtggttcatcgccacctccaaagccgggtcgccgcccctccaaagctggg
A D G G S S P P P K A G S P P P P K A G
tcgccgcccgcctcctaaagacaagtcacgcccgcgcctcctaaagacaagtcacgccc
S P P P P K D K S S P P P P K D K S S P
ccgcctcctaaagacaagtcacgcccgcgcctcctaaagacaagtcgcccgtcgcccccg
P P P K D K S S P P P P K D K S P S P P
cctcctaaagacaagtcgcccgtcgccccgcctcctaaagacaagtcgcccgtcgcccccg
P P K D K S P S P P P P K D K S P S P P
cctcctaaagacaagtcgcccgcgccaccgcctcctaaagacaagtcgcccgcgcctcct
P P K D K S P P P P P P K D K S S P P P
cccaaacacgaaatgcctttgtcaagaaaatccaaaataaaggccaaatcctag
P K H E M P L S R K S K I K A K S -

```

Figura 9: Secuencia aminoacídica y ADNc que codifica para la forma completa del presursor de defensina de *S. marianum*, *DefSm1*. Se indica en rojo la región correspondiente al péptido señal, en negrita el dominio defensina (*DefSm1D*) y subrayado el dominio de rico en prolina.

4.1.2 Clonación

4.1.2.1 Clonación del dominio defensina en el vector pDONR221

A partir de las construcciones *pDONR222-DefSm1* y *pTZ57R/T-DefSm1* por PCR se amplificó el dominio defensina flanqueado por los sitios de recombinación *attB*. La reacción de amplificación en ambos casos dio como resultado una banda intensa entre 200 y 250 pb y una banda mucho más débil de 450 pb (Figura 10). La banda intensa se corresponde con el tamaño esperado para el dominio defensina con los sitios *attB* que es de 237 pb.

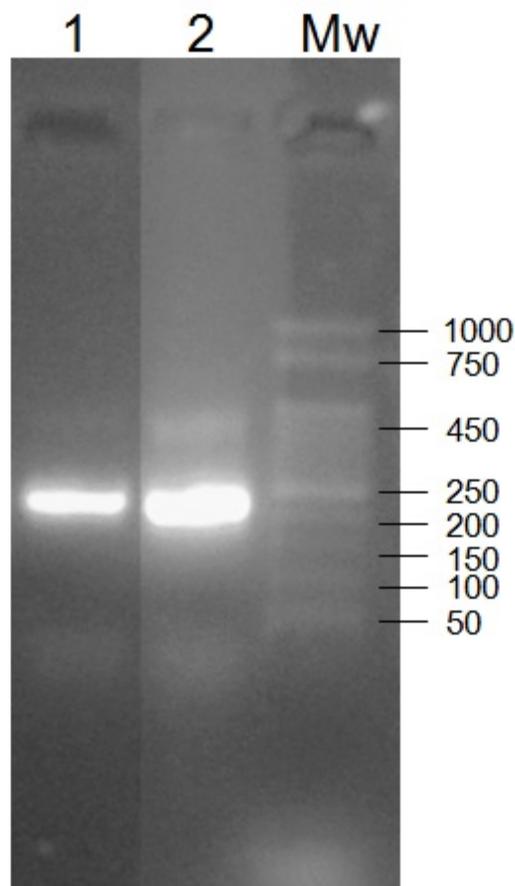


Figura 10: Amplificación de la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto del dominio defensina. Análisis electroforético en gel de agarosa (1,5%) del producto amplificado por PCR. *Calle 1:* Amplificación empleando como molde la construcción *pDONR222-DefSm1*. *Calle 2:* Amplificación empleando como molde la construcción *pTZ57R/T-DefSm1*. *Mw:* Marcador de masas moleculares de ADN Ladder 50 pb precisión (PB-L, Productos Bio-lógicos).

Debido a que en la reacción de PCR se observó un subproducto, se procedió a purificar desde el gel la banda del tamaño esperado. La eficiencia de la purificación fue verificada por electroforesis como se muestra en la Figura 11.

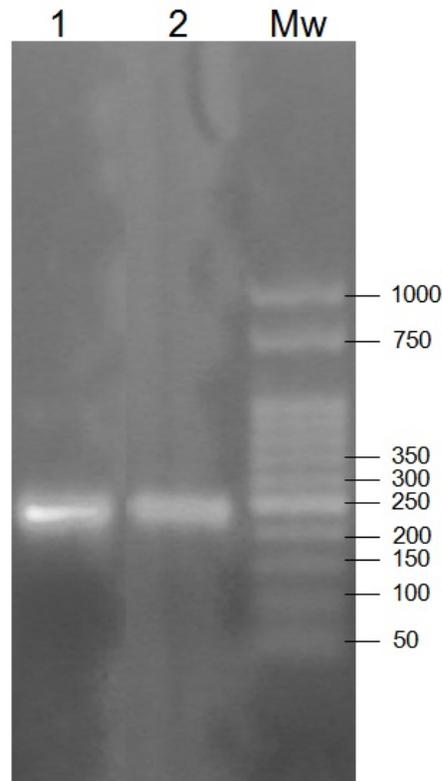


Figura 11: Chequeo de la purificación de DNA. Análisis electroforético en gel de agarosa (1,5%) del producto de la purificación. Calle 1: Purificación del producto de la amplificación empleando como molde la construcción *pDONR222-DefSm*. **Calle 2:** Purificación del producto de la amplificación empleando como molde la construcción *pTZ57R/T-DefSm*. **Mw:** Marcador de masas moleculares de ADN Ladder 50 pb precisión (PB-L, Productos Bio-lógicos).

Los productos de la purificación se utilizaron posteriormente para llevar a cabo las respectivas reacciones de recombinación BP. El vector de entrada utilizado fue el pDONR221. La reacción de recombinación fue luego utilizada para transformar *E. coli* DH5 α . Se purificaron los plásmidos de colonias seleccionadas al azar y para corroborar la presencia del inserto se realizó un análisis de restricción con la enzima BsrGI. El mapa de restricción del vector pDONR221 se muestra en la sección Material Suplementario 6.1, Capítulo 6. De acuerdo a la digestión teórica realizada con el servidor *RestrictionMapper*, el vector pDONR221 tendría un perfil de digestión con 3 fragmentos de 2514 pb, 1458 pb y 790 pb; mientras que la construcción *pDONR221-DefSm1D* tendría un perfil con dos

fragmentos, de 2514 pb y 206 pb. La construcción posee un fragmento menos ya que al producirse la recombinación, se pierde el *cassette* que contiene al gen *ccdB*, el cual incluye uno de los sitios de restricción de BsrGI (Ver construcción *pDONR221-DefSm1D* en el capítulo 6: Material Suplementario 6.3).

La Figura 12 muestra el resultado de la digestión realizada. En el caso de los tres clones ensayados se observó el resultado esperado: 1 banda de aproximadamente 206 pb y otra de aproximadamente 2514 pb, tal como se observa en las calles 4, 5 y 6.

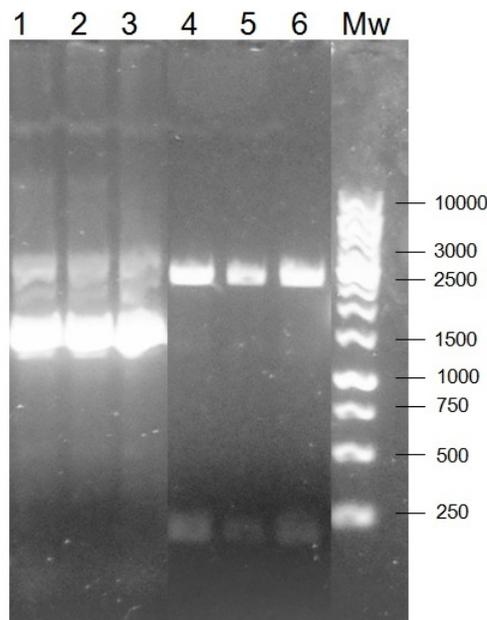


Figura 12: Análisis de restricción con la enzima Bsp1407I (BsrGI). Análisis electroforético en gel de agarosa (0,8%) del producto de la digestión. *Calle 1, 2 y 3:* Minipreparaciones de los clones 1, 2 y 3, respectivamente. *Calle 4:* Digestión de las minipreparaciones de los clones 1, 2 y 3, respectivamente, empleando la enzima BsrGI. *Mw:* Marcador de masas moleculares de ADN GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

También se realizó una reacción de PCR, a fin de chequear la construcción a través de otro método (descrito en la sección 3.3.5 del capítulo 3). Se emplearon cebadores externos al inserto y el tamaño esperado del fragmento a amplificar era de 544 pb. El resultado de la reacción de PCR se muestra en la Figura 13. Para dos de los tres clones ensayados se observó un patrón similar, con 3 bandas de 300 pb, una banda muy intensa del tamaño esperado y una de más de 1000 pb. Dado que se observaron bandas adicionales, las condiciones de

reacción de PCR deberían haberse optimizado a fin de amplificar en forma más específica el fragmento deseado. Esto no se realizó debido a que la secuenciación de las muestras correspondientes a dos clones realizada a través del servicio de secuenciación del INTA confirmó la presencia del inserto. Tanto las secuencias como los cromatogramas obtenidos se analizaron mediante el programa BioEdit, lo que permitió corroborar que el clon 3 tenía la secuencia completa del dominio defensina, en marco y sin mutaciones. En el capítulo 6, en la sección Material Suplementario 6.3 se muestra la construcción *pDONR221-DefSm1D* obtenida.

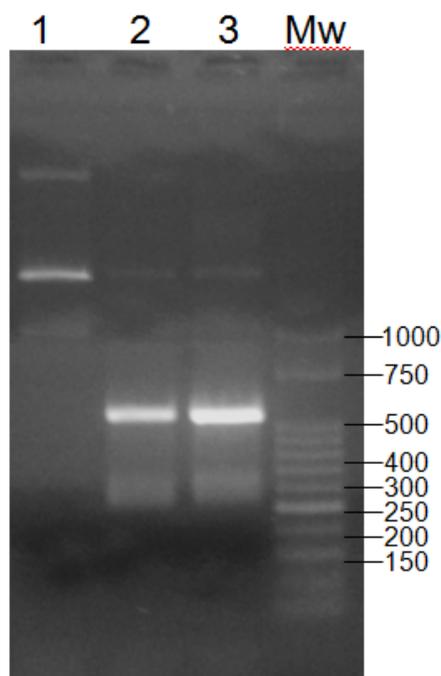


Figura 13: Chequeo de la presencia del inserto por PCR. Análisis electroforético en gel de agarosa (1,5%) del producto de la purificación. *Calle 1, 2 y 3:* Amplificación empleando como molde la minipreparación del clon 1, 2 y 3, respectivamente. *Mw:* Marcador de masas moleculares de ADN Ladder 50 pb precisión (PB-L, Productos Bio-lógicos).

4.1.2.2 Clonación del dominio defensina en el vector p0GWA

A continuación, se empleó la construcción previamente obtenida, *pDONR221-DefSm1D*, para realizar la reacción de recombinación LR. El vector de expresión utilizado fue el p0GWA. Luego de la recombinación, el producto obtenido fue utilizado para transformar *E. coli TOP10* y a partir de colonias seleccionadas al azar se llevó a cabo una *colony-PCR* (Figura 14) a fin de chequear la construcción. Para este ensayo se emplearon los cebadores que se

utilizaron para amplificar el dominio defensina (TP640 y L641R), ya que luego de la recombinación LR se regeneraron los sitios *attB*. El tamaño del fragmento esperado era de 237 pb. La reacción de PCR realizada dio el resultado esperado, ya que se observó una banda de aproximadamente 250 pb para todos los clones ensayados. En el capítulo 6, en la sección Material Suplementario 6.4 se muestra el mapa de la construcción *p0GWA-DefSm1D* obtenida.

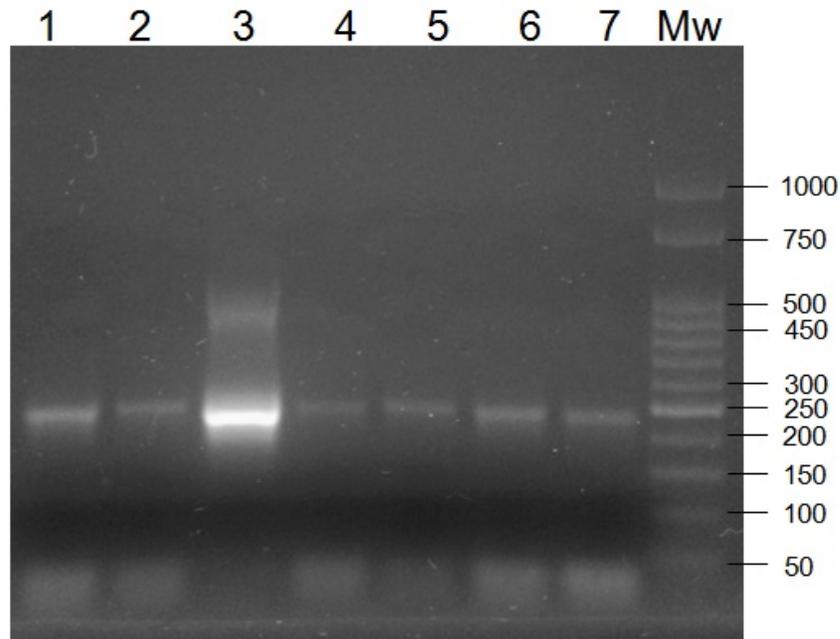


Figura 14: Colony-PCR. Análisis electroforético en gel de agarosa (1,5%) del producto amplificado por PCR. Calle 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: Amplificación empleando como molde al clon 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Mw: Marcador de masas moleculares de ADN Ladder 50 pb precisión (PB-L, Productos Bio-lógicos).

4.1.3 Análisis bioinformático

En primer lugar, se realizó una búsqueda de similitud secuencial empleando el servidor BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), la cual mostró que el dominio defensina DefSm1D presenta un 77% de identidad con Art v 1 (aislada a partir del polen de *Artemisia vulgaris*) con un *E-value* de 1×10^{-8} , un 73% de identidad con SF18 (proveniente de antera de *Helianthus annuus*) con un *E-value* de 7×10^{-15} , un 65% de identidad con DmAMP1 (de semillas de *Dahlia merckii*) con un *E-value* de 1×10^{-13} , un 62% de identidad con una defensina de *Eclipta prostrata* con un *E-value* de 4×10^{-13} , un 59% de identidad con AhAMP (de semillas de *Aesculus hippocastanum*) con un *E-value* de 3×10^{-9} y un 51% de identidad con

CtAMP1 (de semillas de *Clitoria ternatea*) con un E -value de 2×10^{-6} . El alineamiento entre los dominios defensina de las proteínas mencionadas se muestra en la Figura 16A.

Por otra parte, también se realizó un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de DefSm1D y RsAFP1 de *Raphanus sativus*, que es una defensina modelo de plantas y se utiliza como referencia, a fin de comparar y evaluar cuáles residuos se encuentran conservados en el dominio defensina DefSm1D en relación con los de RsAFP1. Esto se muestra en la Figura 16B.

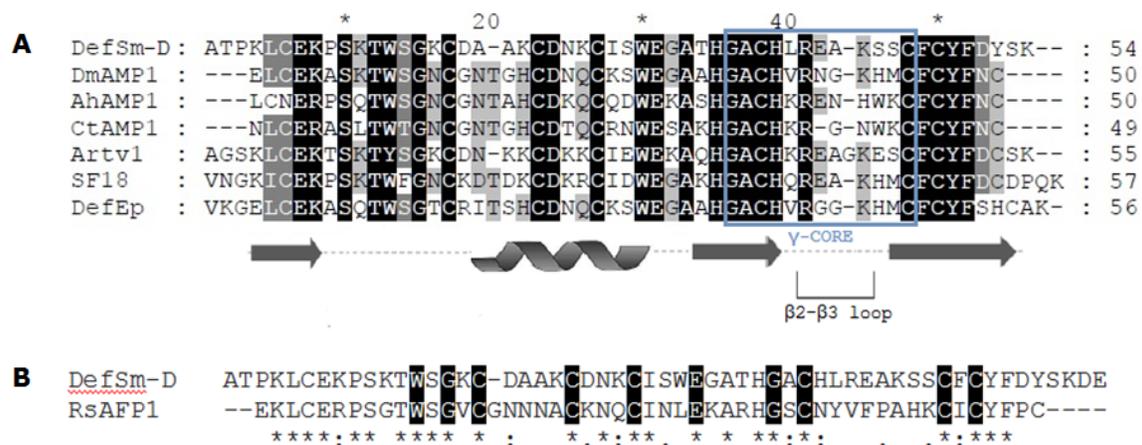


Figura 16: Alineamientos

A. Alineamiento múltiple entre DefSm1D, DmAMP1 (P0C8Y4.1), AhAMP1 (Q7M1F3.1), CtAMP1 (Q7M1F2.1), Art v 1 (Q84ZX5.1), SF18 (P22357.1) y la defensina de *E. prostrata* (AHM10372.1). Las secuencias fueron alineadas a través del programa T-Coffee e importadas al programa GeneDoc. Se utilizaron cuatro niveles de conservación: 100% de conservación con fondo negro; 80% de conservación con fondo gris y letra blanca; 60% de conservación fondo gris con letra negra y menor al 60% de conservación con fondo blanco. Debajo del alineamiento se muestra la predicción de la estructura secundaria. Las flechas representan la posición de las hojas β y la hélice representa la posición de la α -hélice. Se indica también la posición y la composición aminoacídica del γ -core con un recuadro azul.

B. Comparación entre las secuencias aminoacídicas DefSmD y RsAFP1. Con fondo negro y letra blanca se muestran los residuos conservados entre todas las defensinas vegetales.

4.1.3.1 Modelado molecular por homología

A partir del *fold assignment* (sección 3.3.11.1 en el Capítulo 3) se determinó que el molde más adecuado fue Art v 1 de *Artemisia vulgaris*, con una identidad del 76% y un E -value de $3,1 \times 10^{-25}$.

Por esto, utilizando el programa Modeller se llevó a cabo el modelado molecular por homología, empleando como molde a esta proteína. Se

construyeron 100 modelos, de los cuales se evaluó el valor de la función objetivo (*objective function*) para cada uno a fin de elegir el mejor; siendo este el que minimiza el valor de dicho parámetro y se corresponde con el modelo que viola el menor número de restricciones espaciales.

En la Figura 17, se muestra el modelo molecular elegido (Figura 17A) y la predicción de la estructura secundaria (Figura 17B) de DefSm1D.

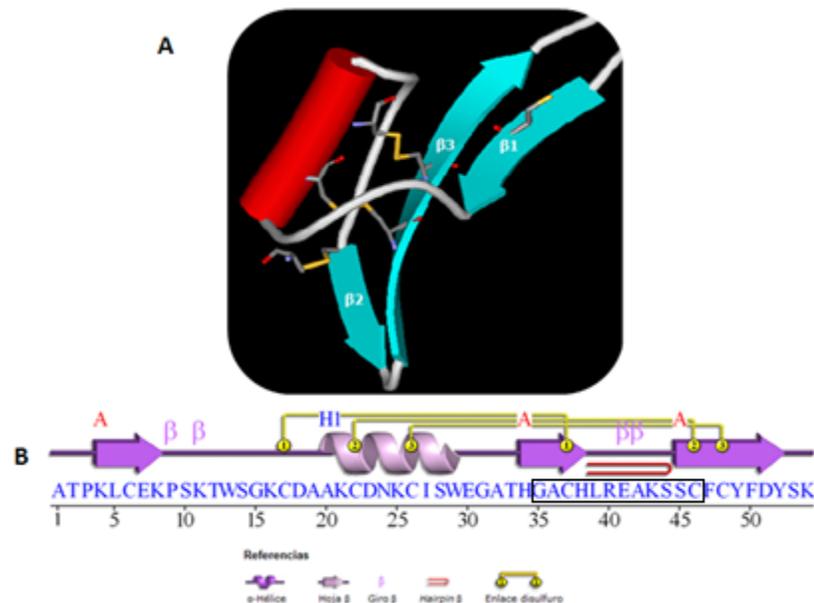


Figura 17: Predicción de la estructura secundaria y terciaria de DefSm1D. **A.** Modelo tridimensional de DefSm1D construido a partir del modelado molecular por homología con el programa MODELLER. En rojo se observa la α -hélice y en celeste las tres hojas β . Se muestran los residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro (en amarillo). El modelo fue visualizado a través del programa WebLab Viewer Lite (3.20). **B.** Estructura secundaria de DefSm1D. Esta imagen fue obtenida a partir del servidor ProFunc. Se muestra recuadrado en negro el γ -core.

El modelo tridimensional obtenido muestra la estructura típica de una defensina: una α -hélice y tres hojas β orientadas en forma antiparalela. Asimismo, se observan los tres puentes disulfuro en los cuales hay seis cisteínas involucradas: la cisteína 17 forma un enlace disulfuro con la cisteína 37, la cisteína 22 con la 46 y la 26 con la 48 (numeración relativa a DefSm1D). Todo esto forma parte del motivo característico que exhiben las defensinas vegetales: α/β estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$), explicado en la sección 1.3.3.2 del capítulo 1. Existe también una séptima cisteína ubicada en la región N-terminal, que en muchas defensinas de plantas es la que está involucrada en un cuarto enlace

disulfuro con una cisteína en la región C-terminal resultando en proteínas pseudo-cíclicas, característica que no se encuentra presente en el caso de la defensina DefSm1D.

4.1.3.2 Evaluación del modelo tridimensional obtenido

El modelo elegido fue sometido a diversos análisis para evaluar su calidad. El análisis energético global llevado a cabo a través del servidor ProSa-Web arrojó como resultado un *Z-score* de -4.3, valor similar al de Art v 1 (*Z-score* de -4.34). El *Z-score* del modelo obtenido se muestra en un gráfico que contiene los *Z-score* correspondientes a todas las proteínas cristalizadas y depositadas en la base de datos PDB (Figura 18A). El análisis energético local realizado con el mismo servidor (Figura 18B) mostró que el modelo no presenta en general partes problemáticas. Valores de energía positivos corresponden a partes erróneas o problemáticas de la estructura de entrada. El cálculo de energía se realizó en base a una ventana de 40 aminoácidos (curva verde oscura) y de 10 aminoácidos (curva verde claro). Estos resultados fueron coherentes con los obtenidos a través del cálculo del potencial DOPE, realizado con el Modeller (Figura 19).

El análisis estructural se realizó con el programa PROCHECK y se obtuvo el diagrama de Ramachandran que mostró un porcentaje de 87,2% de residuos en las regiones más favorecidas, un 6,4% en regiones adicionales permitidas y 6,4% en regiones generosamente permitidas. No se encontraron residuos en las regiones no permitidas (Figura 20). En este diagrama, es posible visualizar las combinaciones más probables de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi), determinadas a partir de estructuras de proteínas ya cristalizadas

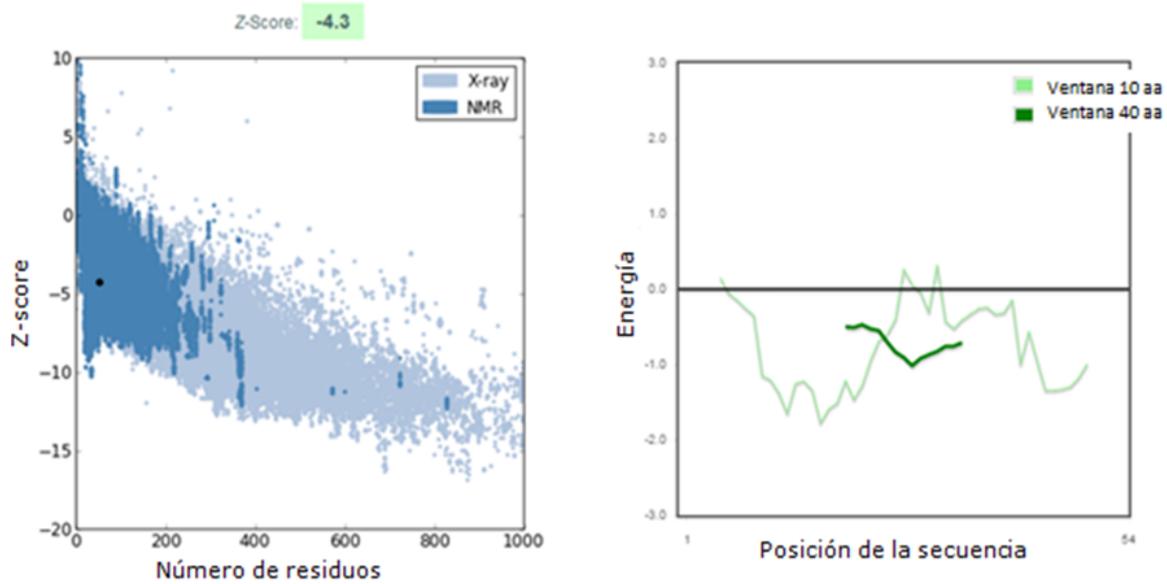


Figura 18: Evaluación energética del modelo. Realizada con el servidor ProSA-web. **A.** Evaluación global del modelo. Se observó un valor de Z-score de -4.3. **B.** Evaluación local del modelo. Muestra la energía en función de la posición de cada residuo. El cálculo de la energía se realizó con una ventana de 10 aminoácidos (curva verde claro) y con una ventana de 40 aminoácidos (curva verde oscuro).



Figura 19: Perfil energético del modelo calculado con el programa Modeller. Se muestra el DOPE score (cuyo cálculo fue realizado empleando el potencial estadístico DOPE—*Discrete Optimized Protein Energy*) en función de la posición, es decir, del número de residuo.

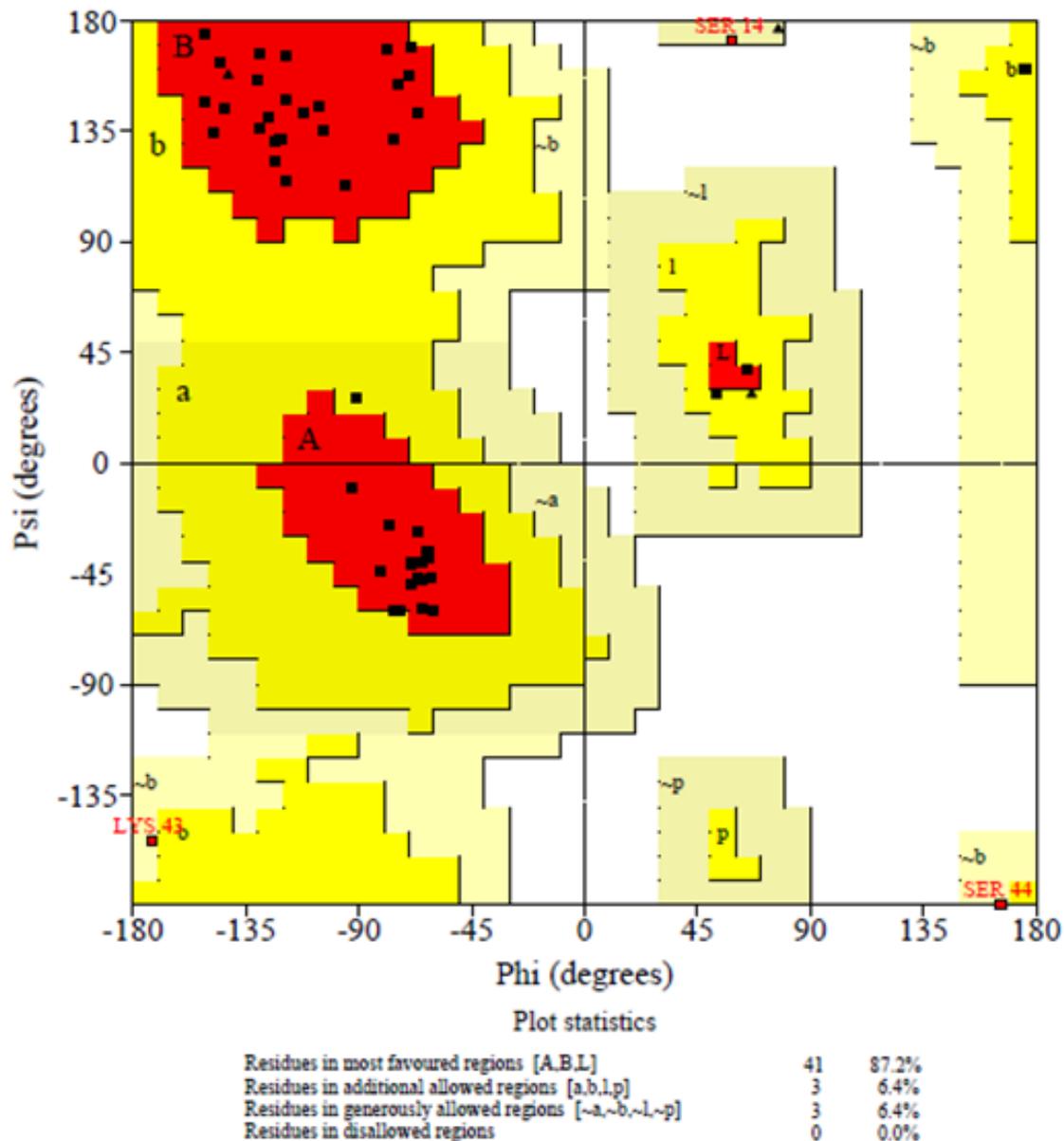


Figura 20: Evaluación estructural del modelo: diagrama de Ramachandran. Este diagrama obtenido a través del programa PROCHEK.

4.1.3.3 Predicción funcional

En base al análisis realizado con el servidor ProFunc, pudieron identificarse los términos GO más comunes que describirían la función putativa del dominio DefSm1D. La Figura 21 muestra el resultado obtenido para los términos GO: Componente celular (*cellular component*), Proceso biológico (*biological process*) y Función molecular (*molecular function*).

ProFunc

| Type | GO no. | Description | Score | BLAST | IPR | SUP | PDB | SSM | ENZ | DNA | LIG | REV |
|-----------------------------|---------|---|--------------|-------------------|-----------------|-----|-------------------|------------------|-----|-----|-----|-------------------|
| Cellular component | | | | | | | | | | | | |
| | 0005576 | extracellular region | 28.22 | <u>5.81</u> (10) | - | - | <u>12.85</u> (19) | <u>1.92</u> (3) | - | - | - | <u>7.65</u> (12) |
| | 0005618 | cell wall | 0.90 | <u>0.90</u> (1) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0005623 | cell | 0.90 | <u>0.90</u> (1) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0044464 | cell part | 0.90 | <u>0.90</u> (1) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0030312 | external encapsulating structure | 0.90 | <u>0.90</u> (1) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Biological process | | | | | | | | | | | | |
| | 0006952 | defense response | 58.95 | <u>22.78</u> (44) | <u>0.02</u> (2) | - | <u>17.00</u> (25) | <u>6.45</u> (10) | - | - | - | <u>12.70</u> (19) |
| | 0050896 | response to stimulus | 58.95 | <u>22.78</u> (44) | <u>0.02</u> (2) | - | <u>17.00</u> (25) | <u>6.45</u> (10) | - | - | - | <u>12.70</u> (19) |
| | 0006950 | response to stress | 58.95 | <u>22.78</u> (44) | <u>0.02</u> (2) | - | <u>17.00</u> (25) | <u>6.45</u> (10) | - | - | - | <u>12.70</u> (19) |
| | 0051704 | multi-organism process | 21.32 | <u>4.47</u> (8) | - | - | <u>11.39</u> (17) | <u>3.10</u> (5) | - | - | - | <u>2.36</u> (4) |
| | 0031640 | killing of cells of another organism | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0050832 | defense response to fungus | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0001906 | cell killing | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0051707 | response to other organism | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0009620 | response to fungus | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0009607 | response to biotic stimulus | 15.88 | <u>4.06</u> (8) | - | - | <u>6.57</u> (11) | <u>3.01</u> (5) | - | - | - | <u>2.24</u> (4) |
| | 0009405 | pathogenesis | 3.80 | - | - | - | <u>3.80</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0044419 | interspecies interaction between organisms | 3.80 | - | - | - | <u>3.80</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0044403 | symbiosis, encompassing mutualism through parasitism | 3.80 | - | - | - | <u>3.80</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0008152 | metabolic process | 2.10 | - | - | - | <u>2.10</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0006508 | proteolysis | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0009056 | catabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0009057 | macromolecule catabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0043285 | biopolymer catabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0030163 | protein catabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0043170 | macromolecule metabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0043283 | biopolymer metabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0019538 | protein metabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0044238 | primary metabolic process | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0042742 | defense response to bacterium | 0.72 | - | - | - | <u>0.72</u> (7) | - | - | - | - | - |
| | 0009617 | response to bacterium | 0.72 | - | - | - | <u>0.72</u> (7) | - | - | - | - | - |
| Biochemical function | | | | | | | | | | | | |
| | 0008200 | ion channel inhibitor activity | 7.90 | - | - | - | <u>4.07</u> (7) | - | - | - | - | <u>3.83</u> (9) |
| | 0015457 | auxiliary transport protein activity | 7.90 | - | - | - | <u>4.07</u> (7) | - | - | - | - | <u>3.83</u> (9) |
| | 0016247 | channel regulator activity | 7.90 | - | - | - | <u>4.07</u> (7) | - | - | - | - | <u>3.83</u> (9) |
| | 0016248 | channel inhibitor activity | 7.90 | - | - | - | <u>4.07</u> (7) | - | - | - | - | <u>3.83</u> (9) |
| | 0046872 | metal ion binding | 2.38 | - | - | - | <u>2.38</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0005488 | binding | 2.38 | - | - | - | <u>2.38</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0043167 | ion binding | 2.38 | - | - | - | <u>2.38</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0043169 | cation binding | 2.38 | - | - | - | <u>2.38</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0003824 | catalytic activity | 2.10 | - | - | - | <u>2.10</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0016787 | hydrolase activity | 2.10 | - | - | - | <u>2.10</u> (6) | - | - | - | - | - |
| | 0019871 | sodium channel inhibitor activity | 2.07 | - | - | - | <u>1.42</u> (3) | - | - | - | - | <u>0.65</u> (1) |
| | 0017080 | sodium channel regulator activity | 2.07 | - | - | - | <u>1.42</u> (3) | - | - | - | - | <u>0.65</u> (1) |
| | 0004222 | metalloendopeptidase activity | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0008237 | metallopeptidase activity | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0008233 | peptidase activity | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0070011 | peptidase activity, acting on L1-amino acid peptides | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0004175 | endopeptidase activity | 0.98 | - | - | - | <u>0.98</u> (5) | - | - | - | - | - |
| | 0003796 | lysozyme activity | 0.70 | - | - | - | <u>0.70</u> (1) | - | - | - | - | - |
| | 0016798 | hydrolase activity, acting on glycosyl bonds | 0.70 | - | - | - | <u>0.70</u> (1) | - | - | - | - | - |
| | 0004553 | hydrolase activity, hydrolyzing O1-glycosyl compounds | 0.70 | - | - | - | <u>0.70</u> (1) | - | - | - | - | - |
| | 0008270 | zinc ion binding | 0.70 | - | - | - | <u>0.70</u> (3) | - | - | - | - | - |
| | 0046914 | transition metal ion binding | 0.70 | - | - | - | <u>0.70</u> (3) | - | - | - | - | - |

Figura 21: Cuadro correspondiente a los términos GO más comunes relacionados con el dominio DefSmD. El mismo fue obtenido a partir del servidor ProFunc, y muestra los resultados para cada término GO. En rojo se muestra el *score* total obtenido en función de las coincidencias (*hits*) obtenidas a través de los distintos métodos. Los *score* subrayados y en azul muestran la contribución de cada método al *score* total (con el número de secuencias/estructuras relevantes indicadas en gris y entre paréntesis).

A continuación se detallan algunos de los resultados más significativos (con un *score* mayor a 10) para cada término GO:

- ❖ Componente celular: Región extracelular (con un *score* de 28,22)

- ❖ Proceso biológico: Respuesta de defensa (*score*: 58,95), respuesta frente a estímulos (*score*: 58,95), respuesta frente a estrés (*score*: 58,95), involucrada en la muerte de células de otro organismo (*score*: 15,88), respuesta de defensa frente a hongos (*score*: 15,88), respuesta frente a otro organismo (*score*: 15,88), respuesta frente a estímulos bióticos (*score*: 15,88).
- ❖ Función molecular: No se hallaron resultados significativos para este término.

4.2 Discusión

Los péptidos antimicrobianos constituyen uno de los grupos de péptidos de respuesta a la patogénesis más abundantes entre los organismos eucariotas. Su modo de acción frecuentemente involucra la disrupción de la membrana del patógeno a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, aunque también puede haber mecanismos adicionales. La mayor parte de los PA son ricos en uno o dos aminoácidos, frecuentemente prolina, glicina, histidina, arginina, triptófano o, como en el caso de las defensinas, cisteína. En las plantas, los péptidos ricos en cisteína están particularmente bien representados y se dividen en varias clases (defensinas, heveínas, tioninas, etc). Los miembros de cada clase se pueden expresar constitutivamente como primera línea de defensa en las células periféricas de las estructuras ricas en nutrientes (flores y semillas) o inducidos por diversas vías de señalización por estrés (Silverstein et al. 2007; Sagaram et al. 2011; Li et al. 2014). Las plantas silvestres y las hierbas, por su gran resistencia a las enfermedades, constituyen una valiosa, aunque poco explorada fuente de PA naturales; sin embargo, son muy escasos los trabajos que reportan el estudio de defensinas de este tipo de fuentes.

En el laboratorio fue posible clonar una proteína precursora de defensina a partir de extractos florales de una especie silvestre como lo es el cardo *Silybum marianum*. Esta proteína precursora de 257 aminoácidos comprende el péptido señal, el dominio defensina y un dominio C-terminal rico en prolina. Es frecuente que los péptidos ricos en cisteína se expresen fusionados con otro dominio

proteico que puede ser rico en cisteína, glicina o prolina, como en este caso. A partir de la construcción disponible en el laboratorio y a través de la estrategia explicada, fue posible obtener la construcción *p0GWA-DefSm1D*, que permitirá en un futuro la realización de ensayos de expresión del dominio defensina. Varias defensinas de plantas han sido expresadas en sistemas tanto procarióticos como eucarióticos y las defensinas recombinantes obtenidas han exhibido actividad contra distintos patógenos. La defensina PTH1 de *Solanum tuberosum* fue expresada en *E. coli* BL21 (DE3) y la proteína recombinante presentó actividad antibacteriana contra *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *P. syringae* pv. *syringae* y *P. syringae* pv. *tabaci* y actividad antifúngica contra *C. coccoides* y *B. cinerea* (Kovalskaya & Hammond 2009). Otro caso lo constituye la defensina PDC1, de *Zea mays*, que fue expresada en *E. coli* y *Pichia pastoris* y los ensayos de actividad resultaron en la inhibición de la germinación de esporas y en el crecimiento de *Fusarium graminearum*, aunque vale destacar que los efectos de inhibición fueron más efectivos en el caso del péptido expresado en el sistema eucariótico, es decir, en la levadura *P. pastoris* (Kant et al. 2009). También fue posible expresar la defensina Tfgd1, de la leguminosa *Trigonella foenum-graecum* L., en *E. coli* BL21 (DE3). Los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* demostraron que la defensina recombinante inhibió la propagación de *Rhizoctonia solani* y la germinación de esporas de *Phaeoisariopsis personata* (Olli & Kirti 2006).

En función del análisis bioinformático realizado, pudo obtenerse un modelo tridimensional del dominio defensina, DefSm1D, que permitió corroborar el plegamiento característico de las defensinas vegetales como así también realizar el análisis estructura-función. El modelo obtenido fue sometido a distintos métodos de evaluación que mostraron que la calidad del mismo resultó ser buena.

El estudio de la predicción funcional (realizada empleando como *input* el modelo tridimensional obtenido) a través del servidor ProFunc y los resultados del análisis de búsqueda de similitud secuencial utilizando el BLAST mostraron indicios de que la función putativa del dominio DefSm1D sería la actividad antifúngica. Cuatro de las seis defensinas más relacionadas con DefSm1D son antifúngicas (AhAMP1, CtAMP1, Art v 1 y DmAMP1, Figura 16A) y según la

clasificación de Van der Weerden de 2013 se encuentran juntas en un mismo *cluster* (grupo 9, subgrupo 9.2), lo cual sugiere que DefSm1D puede pertenecer a ese grupo de defensinas. Las defensinas de ese subgrupo incluyen especies de la familia Asteraceae (*S. marianum* pertenece a esta familia), son del tipo no morfogénicas y requieren la presencia de esfingolípidos fúngicos para su actividad (Van der Weerden & Anderson 2013; Thevissen et al. 2004). Más aún, DefSm1D presenta una conservación de los residuos que son importantes para AhAMP1 y Art v 1 en su actividad contra hongos, siendo estos: Gln/Lys8, Thr12, Ser14, Trp29, Arg40 y His/Lys43—numeración relativa a DefSm1D (Himly et al. 2002; Fant et al. 1999).

Entre los distintos grupos de defensinas existe una conservación de secuencia muy limitada. Esto podría sustentar la idea de que si bien hay defensinas que comparten actividades similares, como las antifúngicas, éstas actúan mediante diferentes mecanismos de acción y sobre diferentes patógenos blanco (Van der Weerden et al. 2008). El análisis de la secuencia de DefSm1D (Figura 16B) reveló la presencia de todos los residuos conservados entre las defensinas vegetales, excepto por la cisteína en posición 51 (numeración relativa a RsAFP1). Estos residuos conservados juegan un rol esencial en el plegamiento y/o estabilización de la proteína. Los resultados se condicen con la estructura predicha para el dominio defensina a partir del modelado molecular por homología (Figura 17A).

Según los autores Yount & Yeaman (Yount & Yeaman 2004), el análisis de estructura-función en péptidos antimicrobianos reveló la presencia de un motivo conservado, denominado γ -core. Este motivo se encuentra ampliamente distribuido en todas las defensinas y contiene aminoácidos que son esenciales para su actividad. En el caso de las defensinas MsDef1 (*Medicago sativa*) y MtDef4 (*Medicago truncatula*), se demostró que este motivo es sumamente importante en relación con su actividad antifúngica. El γ -core de la defensina MtDef4 resultó imprescindible para inhibir el crecimiento de una cepa de *F. graminearum*, al igual que en el caso del γ -core de MsDef1 que además posee en dicho motivo algunos de los aminoácidos involucrados en la ramificación de las

hifas (Sagaram et al. 2011). Por otra parte, la defensina RsAFP2 presenta siete de los diez aminoácidos esenciales para su actividad antifúngica localizados dentro de este motivo (Van der Weerden & Anderson 2013). El análisis de la secuencia DefSm1D (Figura 9) reveló la presencia de este motivo que se condice con la estructura predicha resultante del modelado por homología (Figura 17A). La estructura del γ -core conecta las dos hojas β antiparalelas $\beta 2$ y $\beta 3$ y comprenden una región de giro (loop) interpuesta. La importancia de este motivo en la actividad exhibida por las defensinas radica en la presencia de residuos positivos en la región de giro, que podrían interactuar con las cargas negativas en la membrana y/o la pared del patógeno. En el caso de la defensina DefSm1D se detectaron tres aminoácidos positivos en esta región: His 37, Arg 40 y Lys 43. Tanto en la Figura 16A como en la 17B se muestra la secuencia del motivo γ -core de DefSm1D.

El γ -core de DefSm1D es similar al de DmAMP1 (*Dahlia merckii*), AhAMP1 (*Aesculus hippocastanum*) y CtAMP1 (*Clitoria ternatea*) (Figura 20A). Estas tres defensinas tienen la particularidad de que compiten por los mismos sitios de unión en la superficie de las células de *Neurospora crassa* (Thevissen et al. 2000), lo que podría estar directamente relacionado con la similitud entre sus regiones γ -core (Van der Weerden & Anderson 2013). Además, ha sido demostrado que la actividad antifúngica de DmAMP1 está íntimamente vinculada con su capacidad de unirse a las membranas celulares (Thevissen et al. 2000).

CAPÍTULO 5: Conclusiones y Perspectivas

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se diseñó una estrategia para subclonar el dominio defensina (DefSm1D) a partir de construcciones disponibles en el laboratorio, y fue posible obtener una construcción que en un futuro permitirá expresar el dominio defensina con una fusión C terminal de Histidinas, que facilita el proceso de purificación (DefSm1D-His₆).

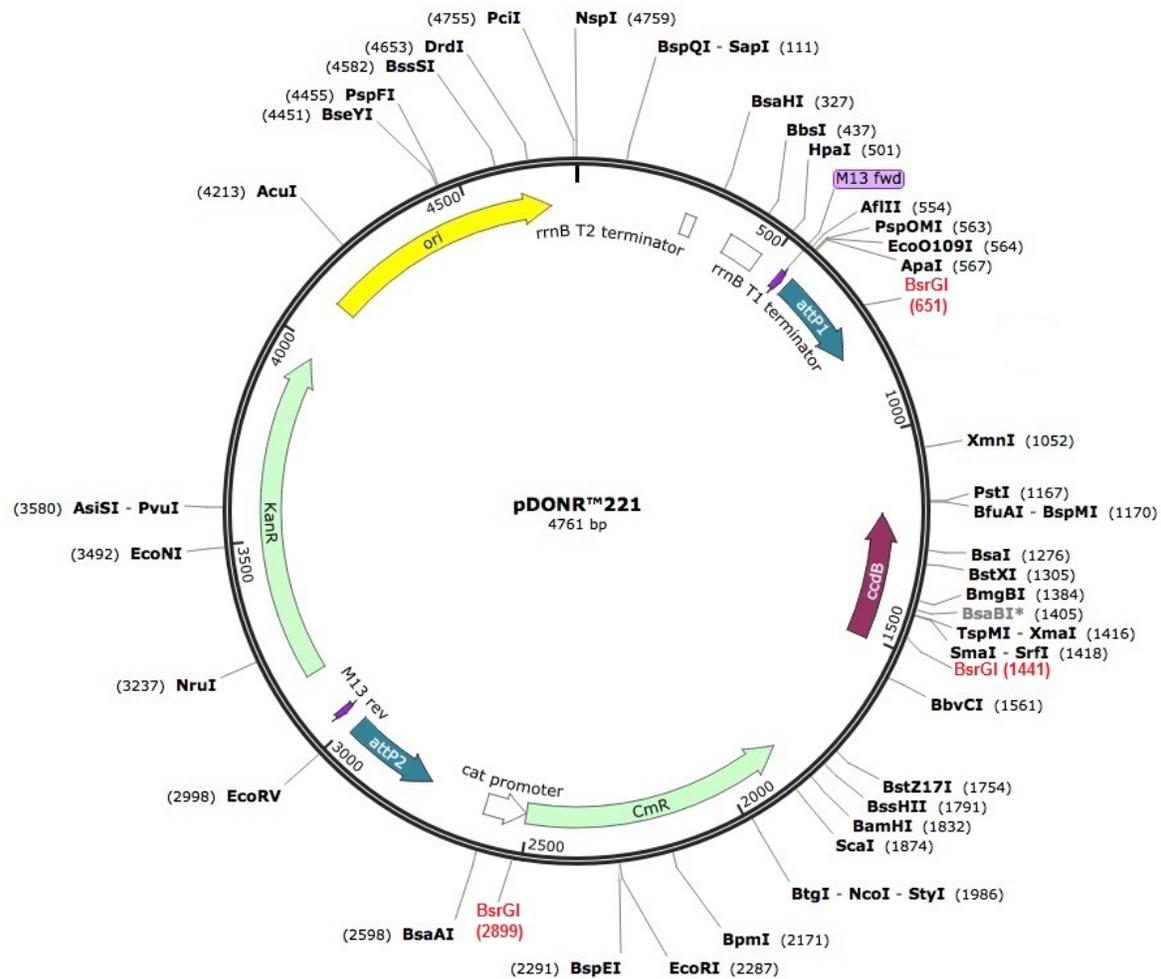
En relación con el análisis bioinformático llevado a cabo, pudo comprobarse que la secuencia del dominio DefSm1D presenta la estructura típica de las defensinas. El análisis de la secuencia de DefSm1D permitió establecer que la misma presenta todos los residuos conservados entre las defensinas vegetales, excepto por la cisteína en posición 51 (numeración relativa a RsAFP1). Estos residuos conservados juegan un rol esencial en el plegamiento y/o estabilización de la proteína. Los resultados se condicen con la estructura predicha para el dominio defensina a partir del modelado molecular por homología. Según la predicción estructural, la proteína DefSm1D posee tres puentes disulfuro, presenta la estructura característica conocida como motivo α/β estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$) y además posee un importante motivo denominado γ -core, presente en los péptidos antimicrobianos y que juega un rol fundamental en la actividad antimicrobiana de los mismos.

En el futuro, la expresión del dominio defensina, DefSm1D, por tecnología del ADN recombinante, permitirá realizar ensayos de actividad antifúngica y de actividad sobre sistemas modelo de membrana para corroborar la actividad putativa que surge del análisis secuencial y estructural aquí presentado. Asimismo, sería interesante realizar ensayos que involucren el diseño de mutantes en sitios específicos del γ -core para así obtener otras especificidades. Estos estudios permitirán determinar cuan promisorio es el dominio DefSm1D para futuras aplicaciones biotecnológicas.

CAPÍTULO 6: Material Suplementario

CAPÍTULO 6: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material Suplementario 6.1

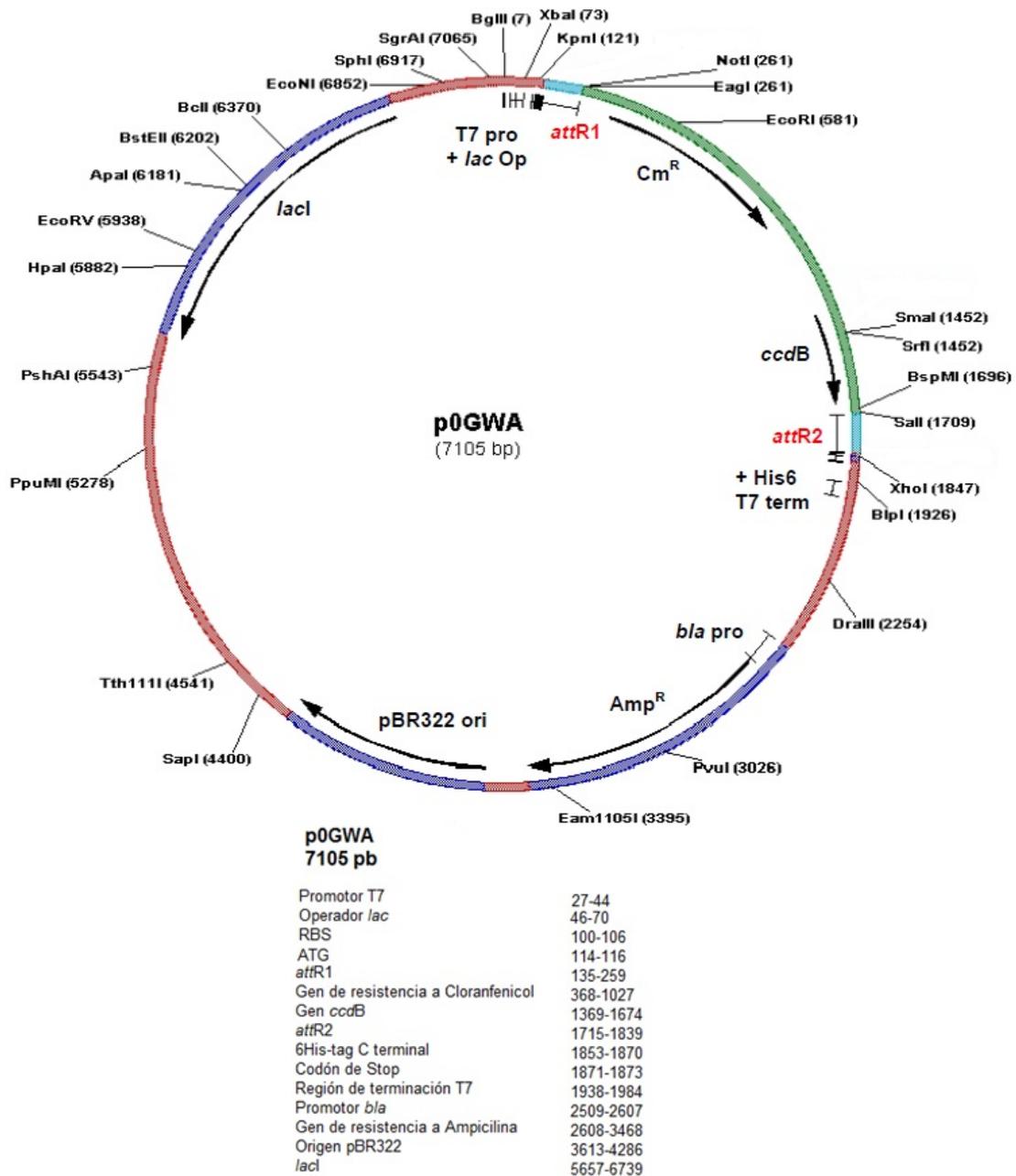


pDONR™221
4761 pb

| | |
|---|-----------|
| <i>rrnB</i> T2, Secuencia de terminación de transcripción | 268-295 |
| <i>rrnB</i> T1, Secuencia de terminación de transcripción | 427-470 |
| M13 Directo (-20), Sitio de hibridación | 537-552 |
| <i>attP</i> 1 | 570-801 |
| Gen <i>ccdB</i> | 1197-1502 |
| Gen de resistencia a cloranfenicol | 1825-2505 |
| <i>attP</i> 2 | 2753-2984 |
| M13 Reverso, Sitio de hibridación | 3026-3042 |
| Gen de resistencia a Kanamicina | 3155-3964 |
| Origen pUC | 4085-4758 |

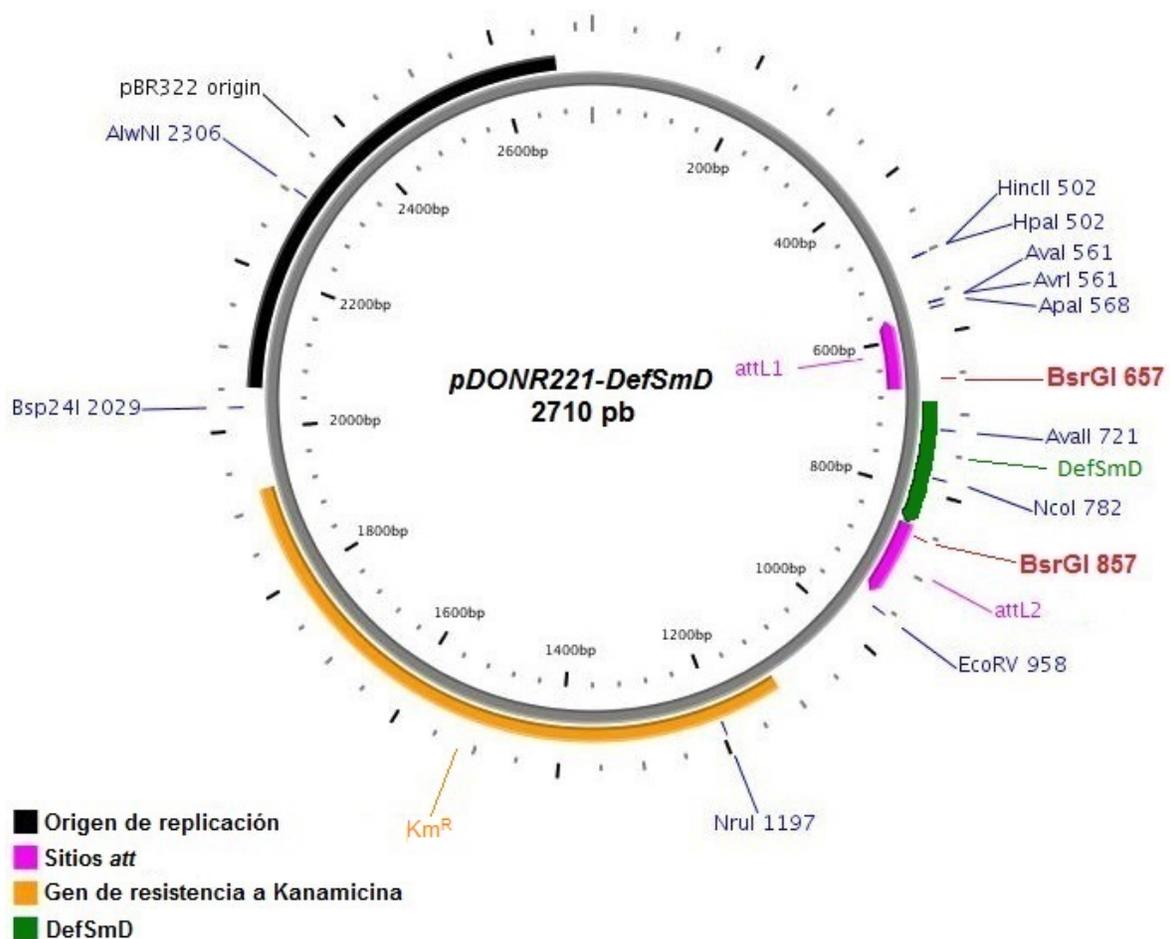
Mapa del vector pDONR221 de tecnología Gateway®. Se muestran sitios de restricción de distintas enzimas. Los sitios de la enzima BsrGI se indican en rojo.

Material Suplementario 6.2



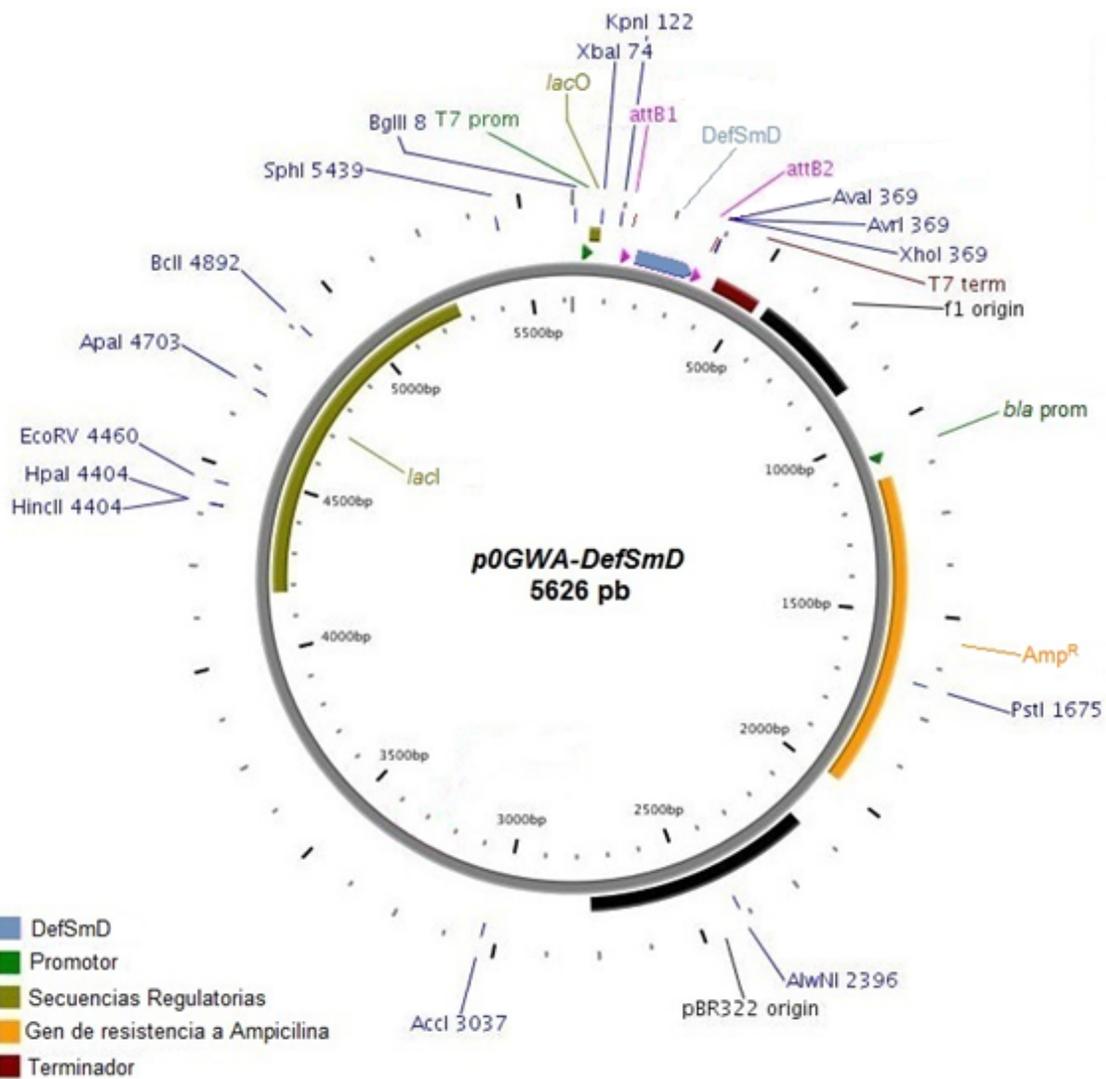
Mapa del vector p0GWA de tecnología Gateway®.

Material Suplementario 6.3



Mapa de la construcción *pDONR221-DefSmD*. Se indican varios sitios de restricción y con rojo los sitios BsrGI. El dominio defensiva, DefSmD, se muestra en color verde, mientras que los sitios *att* se indican con rosa. También se muestra el origen de replicación y el gen de resistencia a Kanamicina. Este mapa fue realizado con el servidor *PlasMapper 2.0*.

Material Suplementario 6.4



Mapa de la construcción p0GWA-DefSmD. Se indican varios sitios de restricción. El dominio defensina, DefSmD, se muestra en color celeste, mientras que los sitios *attB* se indican con rosa. También se muestran los orígenes de replicación, el gen de resistencia a Ampicilina, promotores, terminadores y secuencias regulatorias. Este mapa fue realizado con el servidor *PlasMapper 2.0*.

CAPÍTULO 7: Referencias Bibliográficas

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), pp.783–801. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001905>.

Anaya-López, J.L. et al., 2005. Interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares. , (41), pp.83–96.

Astafieva, a a et al., 2012. Discovery of novel antimicrobial peptides with unusual cysteine motifs in dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Peptides*, 36(2), pp.266–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640720> [Accessed January 19, 2015].

Bernard, P. & Couturier, M., 1992. Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J. Mol. Biol.*, 226, pp.735–745.

Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H., 2015. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), pp.521–539. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.

Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of immunology*, 13, pp.61–92.

Broekaert, W.F. et al., 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant physiology*, 108(4), pp.1353–8.

Brogden, K. a, 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), pp.238–250.

Busso, D., Delagoutte-Busso, B. & Moras, D., 2005. Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*, 343(2), pp.313–21.

Dong, X. et al., 2004. PlasMapper: A web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), pp.660–664.

Fant, F., Vranken, W.F. & Borremans, F. a M., 1999. The three-dimensional solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 37(3), pp.388–403.

Flor, H.H., 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32, pp.653–669.

Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(September), pp.710–720.

Garcia-Olmedo, F. et al., 1998. Plant defense peptides [Review]. *Biopolymers*, 47(6), pp.479–491.

Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M. a., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10(11), pp.1788–1795.

Himly, M. et al., 2002. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *The FEBS journal*, (1).

Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–329.

Kant, P., Liu, W.Z. & Pauls, K.P., 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*, 30(9), pp.1593–1599.

Kobayashi, Y. et al., 1991. The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*, 31(10), pp.1213–1220.

Kovalskaya, N. & Hammond, R.W., 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 63(1), pp.12–17.

Lacerda, A.F. et al., 2014. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*, 5(April), p.116. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3980092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 23, 2015].

Landy, A., 1989. NoDynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, pp.913–941.

Laskowski, R. a. et al., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), pp.283–291.

Laskowski, R. a., Watson, J.D. & Thornton, J.M., 2005. ProFunc: A server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), pp.89–93.

Lay, F.T. & Anderson, M. a, 2005. Defensins-components of the innate immune system in plants. *Current protein & peptide science*, 6(1), pp.85–101.

Li, Y.L. et al., 2014. Identification of small secreted peptides (SSPs) in maize and expression analysis of partial SSP genes in reproductive tissues. *Planta*, pp.713–728.

Newman, M.-A. et al., 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 4(May), p.139. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Nürnberg, T. et al., 2004. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, pp.249–266.

Olli, S. & Kirti, P.B., 2006. Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 39(3), pp.278–283.

Ptashne, M., 1992. A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms. *Cambridge, MA: Cell Press*.

Sagaram, U.S. et al., 2011. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 6(4), p.e18550.

Šali, A. & L., B.T., 1993. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. , pp.779–815.

Silverstein, K.A.T. et al., 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 51(2), pp.262–80.

Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N., 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), pp.244–248.

Stotz, H.U., Waller, F. & Wang, K., 2013. Antimicrobial Peptides and Innate Immunity. *Progress in Inflammation Research*, pp.29–52. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-0541-4>.

Téllez, G.A. & Castaño, J.C., 2010. Péptidos antimicrobianos. , 14(1), pp.55–67.

Terras, F.R. et al., 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant cell*, 7(5), pp.573–588.

Thevissen, K. et al., 2004. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), pp.3900–3905.

Thevissen, K. et al., 2000. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 13(1), pp.54–61.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P. a & Thevissen, K., 2002. Plant defensins. *Planta*, 216(2), pp.193–202.

Di Tommaso, P. et al., 2011. T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp.13–17.

Vriens, K., Cammue, B.P. a & Thevissen, K., 2014. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), pp.12280–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153857> [Accessed January 26, 2015].

Van der Weerden, N.L. & Anderson, M. a., 2013. Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), pp.121–131.

Van der Weerden, N.L., Lay, F.T. & Anderson, M. a, 2008. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *The Journal of biological chemistry*, 283(21), pp.14445–52.

Weisberg, R.A. & Landy, A., 1983. Site-Specific Recombination in Phage Lambda. In Lambda II. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press*, pp.211–250.

Wiederstein, M. & Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), pp.407–410.

Yeaman, M.R. & Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), pp.27–55.

Yount, N.Y. & Yeaman, M.R., 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), pp.7363–7368.