

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ESTUDIO DE DEFENSINAS DE CARDOS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS

Iturralde, Micaela

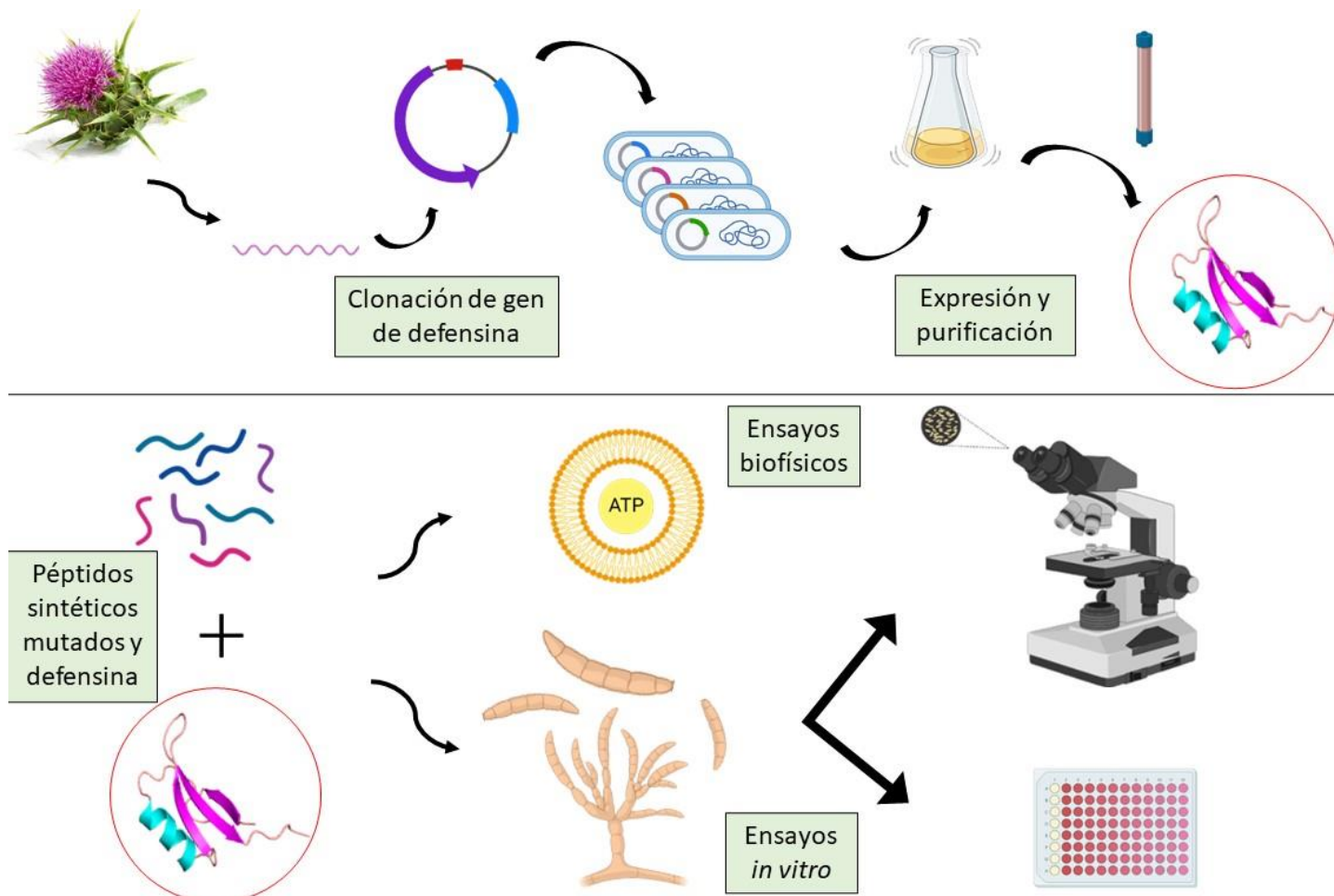
Vairo Cavalli, Sandra (Dir.), Maté, Sabina (Codir.)

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe)

micalaiturralde@biol.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVE: proteómica, microbiología, péptidos antifúngicos, biofísicoquímica**STUDY OF THISTLE DEFENSINS WITH POTENTIAL APPLICATION IN THE CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI PRODUCING MYCOTOXINS**KEYWORDS: proteomic, microbiology, antifungal peptides, biophysicochemistry

Resumen gráfico



Resumen

Para protegerse del ataque por patógenos, las plantas producen una serie de péptidos de defensa del huésped o péptidos antimicrobianos (AMPs) catiónicos, los cuales incluyen a las defensinas. Estos péptidos básicos anfipáticos ricos en cisteína poseen una longitud de 45 a 54 aminoácidos y comparten una homología estructural con las defensinas de insectos, moluscos y mamíferos. La actividad de un AMP está específicamente relacionada con sus propiedades fisicoquímicas, las cuales están dadas por la composición de aminoácidos de la cadena peptídica y su distribución. La unión del AMP a la superficie de una célula microbiana conduce a alteraciones celulares mediante diversos mecanismos como: interacción con las membranas celulares produciendo un cambio en sus propiedades, formando poros y/o conduciendo a su despolarización, impidiendo la biosíntesis de biomoléculas extra o intracelulares, desregulando el flujo de iones en las células y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibiendo la síntesis de ATP.

Se abordará el estudio de defensinas de *Silybum marianum*, un cardo de la familia Asteraceae, con actividad antifúngica contra *Fusarium graminearum*. Los objetivos son: diseñar péptidos derivados de las secuencias de las defensinas de *S. marianum* y obtener mutantes en sitios específicos (relacionados a los de mayor actividad antifúngica); expresar las proteínas en un sistema procariótico, purificarlas y caracterizarlas; y por último estudiar el mecanismo de acción tanto de los péptidos como

de las defensinas. Estas moléculas pueden resultar atractivas para su potencial aplicación agronómica, haciendo foco en el diseño racional de potenciales biofungicidas.

La metodología de trabajo es sintetizar péptidos químicamente a través de una estrategia de fase sólida FMOC y luego serán purificados por HPLC de fase reversa. Los pesos moleculares se confirmarán mediante ESI-MS. Para clonar las defensinas se utilizarán el plásmido pET302Nt/His y la cepa TOP10 de *E. Coli*, y se expresará en la cepa Arctic express, ya que coexpresa unas chaperoninas a bajas temperaturas que favorecen el refolding y protegen de hidrólisis. Se purificarán mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Se realizarán ensayos in vitro de inhibición de crecimiento de conidios de *F. graminearum* y de tiempo de muerte. Se evaluará la producción de ROS como respuesta celular de estrés oxidativo al péptido o proteína y se evaluará la viabilidad celular a través de la exclusión de la sonda yoduro de propidio.

Finalmente, mediante el empleo de sistemas modelo de membranas se estudiará la interacción de las defensinas y péptidos sintéticos con monocapas y bicapas lipídicas de distinta composición. Utilizando difracción circular (da información de la estructura secundaria del péptido en solución/unido a la monocapa), microscopía (confocal, SEM, TEM y AFM) y ensayos con liposomas se estudiará el mecanismo de acción y se interpretarán las relaciones estructura-función.