

# Estudio de péptidos derivados de motivos estructurales de la defensina DefSm2-D de flores de *Silybum marianum* con acción sobre *Fusarium graminearum*: permeabilización de la membrana de conidios y efecto sobre su ultraestructura celular.

Agustina Fernández<sup>1,4\*</sup>, Ismael Malbrán<sup>2,5</sup>, Fanny Guzmán<sup>3</sup>, Laura Bakás<sup>1,5</sup>, Sandra Vairo Cavalli<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Fac. de Cs. Exactas, UNLP-Centro Asociado CIC, 47 y 115, CP 1900 La Plata, Argentina. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI-CIC-UNLP), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP-CIC, 60 y 119, CP 1900 La Plata, Argentina. <sup>3</sup>Núcleo de biotecnología Curauma (NBC), Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Av. Universidad 330, Curauma, Valparaíso, Chile. <sup>4</sup>CONICET, <sup>5</sup>CIC

\*fernandez.agustina@biol.unlp.edu.ar

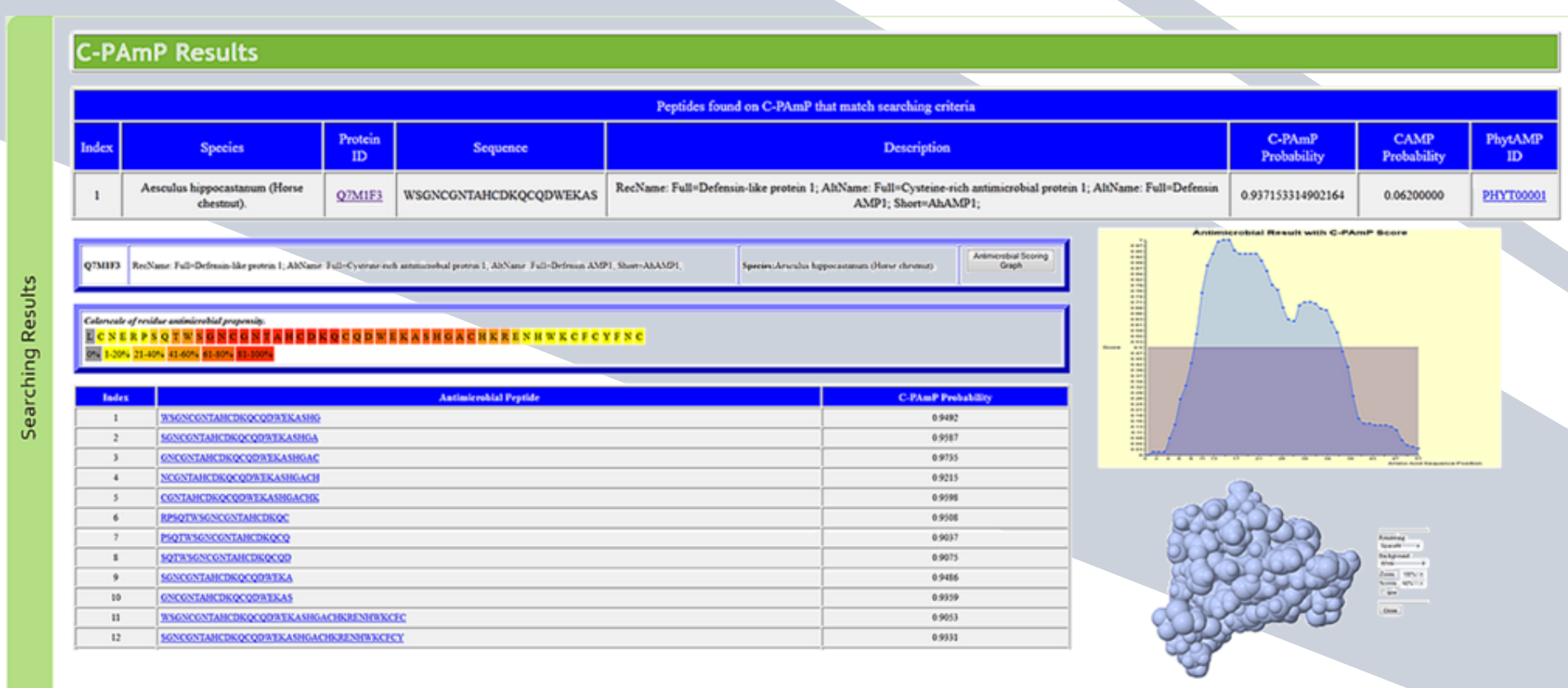
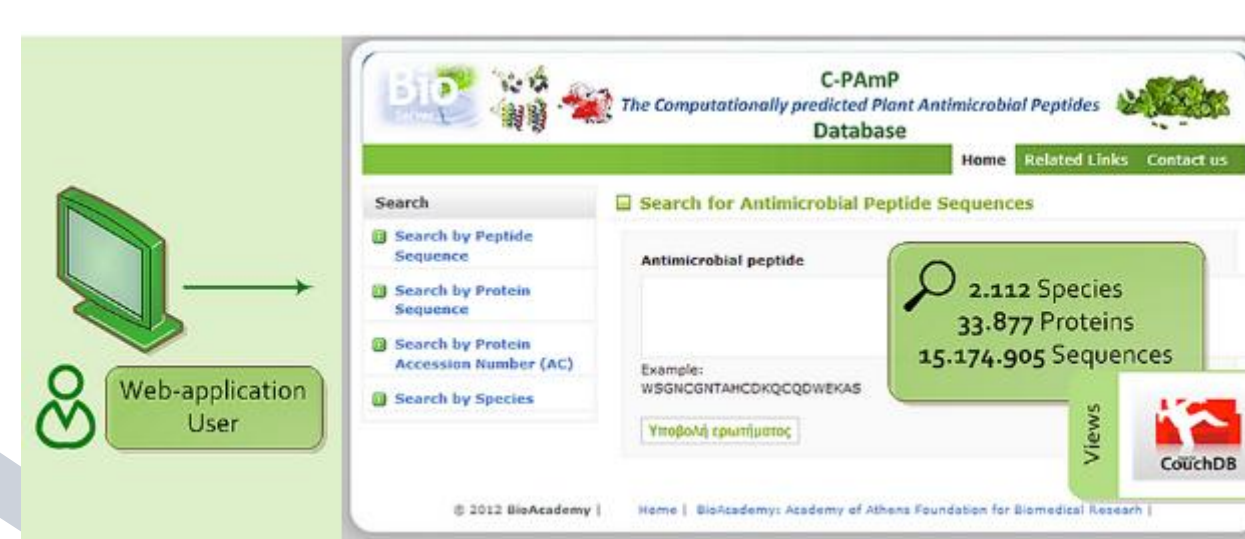
## Introducción

Las defensinas vegetales son pequeñas proteínas catiónicas ricas en cisteína que se expresan de forma ubicua en el reino vegetal y se encuentran involucradas en la defensa inmune innata. Si bien presentan una gran variabilidad a nivel de secuencia, comparten una estructura  $\alpha/\beta$  común, estabilizada por al menos tres puentes disulfuro (CS $\alpha/\beta$ ). Se han identificado dos regiones muy conservadas entre las defensinas vegetales las cuales son importantes en relación con la actividad que exhiben: el  $\gamma$ -core (GXCX<sub>3-9</sub>C) ubicado en la región C-terminal y el  $\alpha$ -core (GXCX<sub>3-5</sub>C) localizado en la región N-terminal. En este trabajo se diseñaron péptidos antifúngicos putativos a partir de la secuencia de una defensina de flores de *Silybum marianum* llamada DefSm2-D y se evaluó su actividad frente al hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum*.

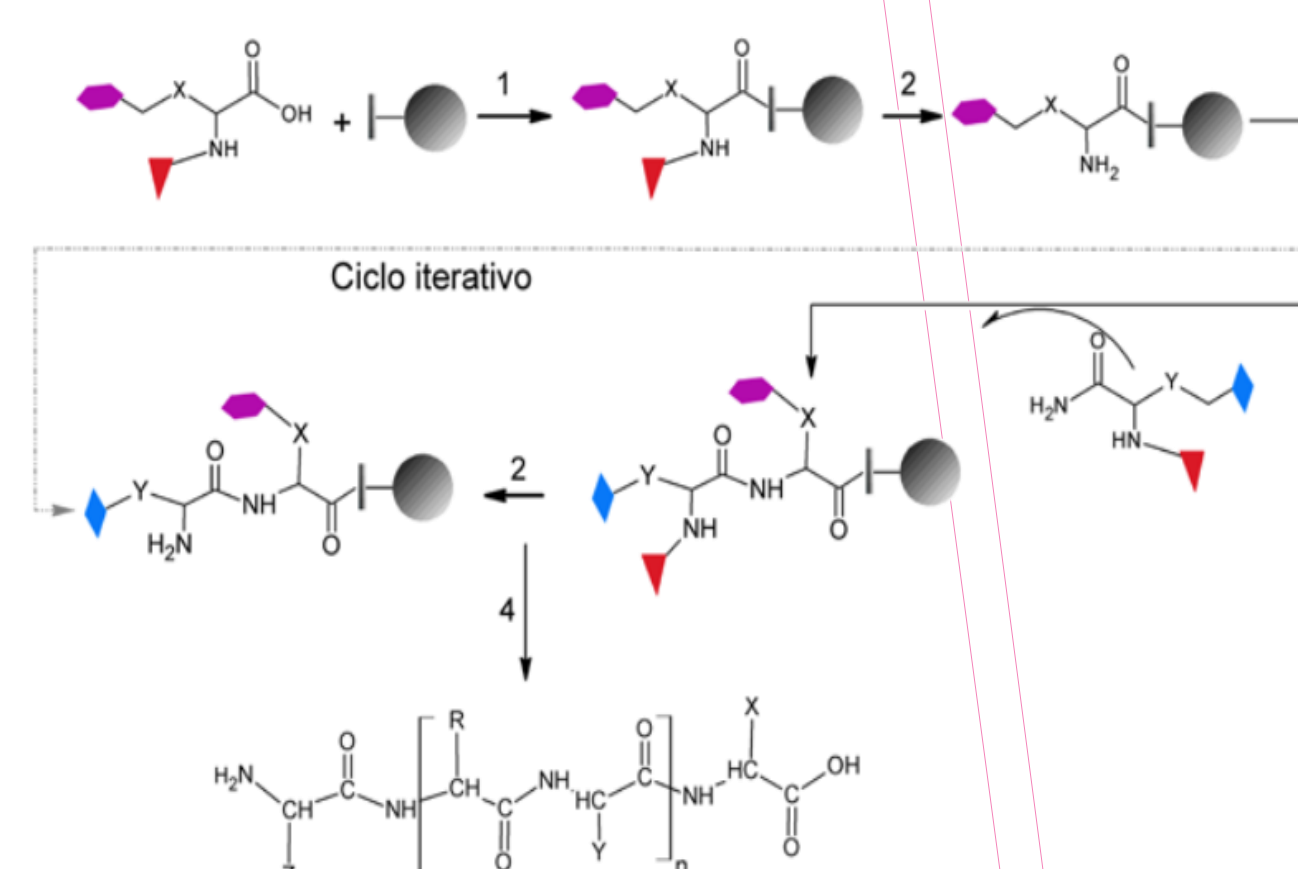
## Materiales & Métodos

### 1. Alineamiento con defensinas relacionadas

### 2. Base de datos C-PAMp



### 3. Síntesis química en fase sólida



Esquema de síntesis en fase sólida.

- 1: acople primer residuo
- 2: desprotección
- 3: acople de los siguientes residuos (ciclo iterativo)
- 4: clivaje y desprotección cadenas laterales

### 4. Ensayos de actividad antifúngica

1. Ensayo de actividad en microplaca (DO 595 nm)
2. Evaluación de la integridad de la membrana de macroconidios usando yoduro de propidio (PI)
3. Evaluación del efecto de los péptidos sintetizados sobre la ultraestructura celular de conidios a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)



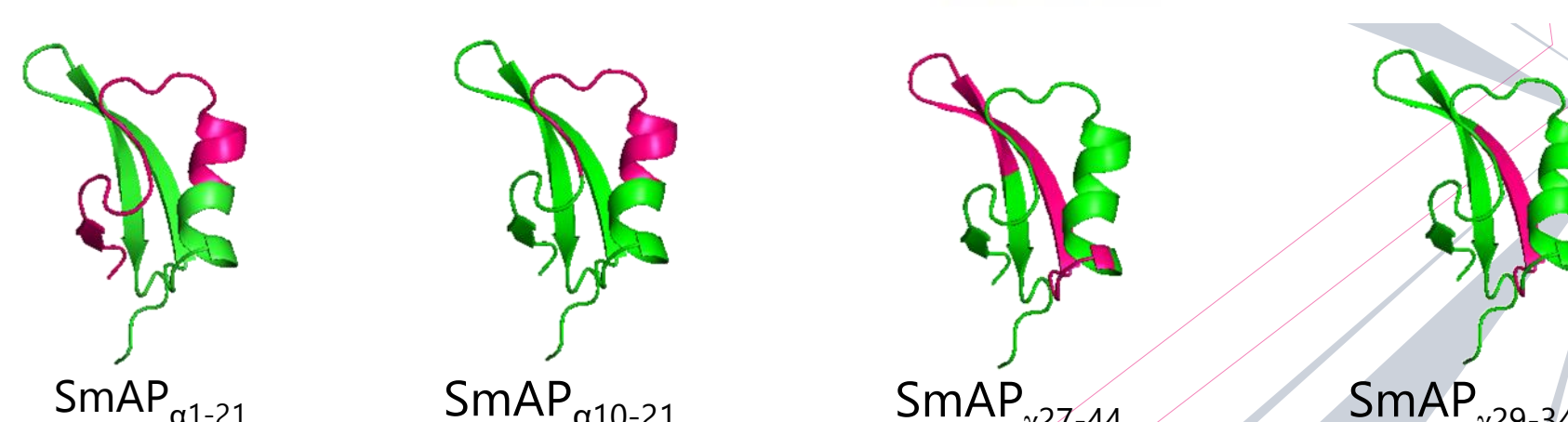
*Fusarium graminearum*

## Resultados

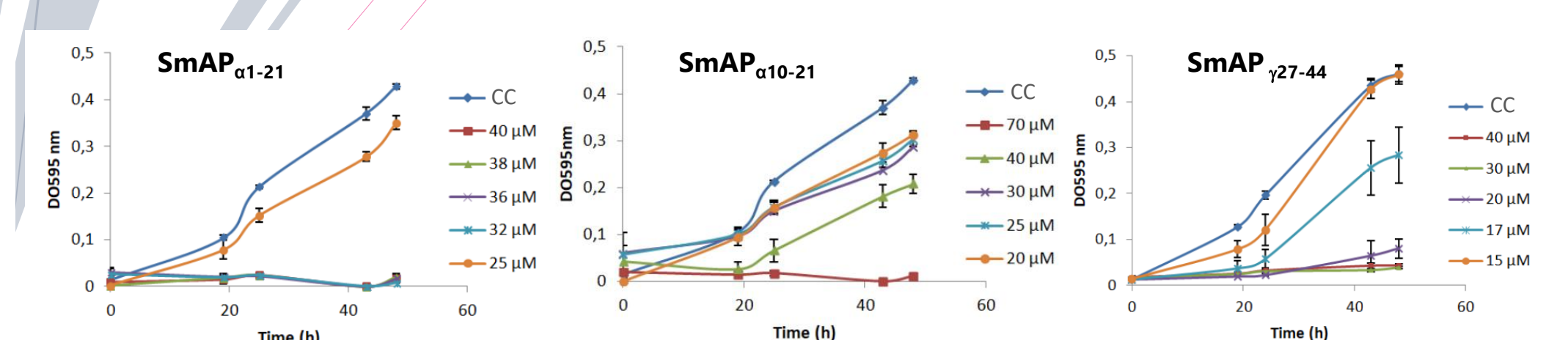
DefSm1D: ATPKLCERESMTWGRGDA-AKQDNRCISWEGAVHGACHUREA-RSSCEFCYFLYSK-- : 54  
 DefSm2 : ---KLCEKESKTFWNGCGNPRHCGDQCKSWEGAVHGACHVWNG-RHMCRCYFNCPQAE : 54  
 AhAMP1 : ---LCNERESKTFWNGCGNPRHCGDQCKSWEGAVHGACHVWNG-RHMCRCYFNCPQAE : 50  
 DmAMP1 : ---ELCERESKTFWNGCGNPRHCGDQCKSWEGAVHGACHVWNG-RHMCRCYFNCPQAE : 50  
 Art v 1 : ---KLCEKESKTFWNGCGNPRHCGDQCKSWEGAVHGACHVWNG-RHMCRCYFNCPQAE : 50

**Alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas de DefSm1D, DefSm2D, AhAMP1 (Q7M1F3.1), DmAMP1 (P0C8Y4.1) y Art v 1 (Q84ZX5.1).** Las secuencias se alinearon empleando ClustalW. Se muestran cuatro niveles de conservación de residuos: 100% de conservación con fondo negro; 80% con fondo gris y letra blanca; 60% con fondo gris y letra negra; menos del 60% con letra negra y fondo blanco.

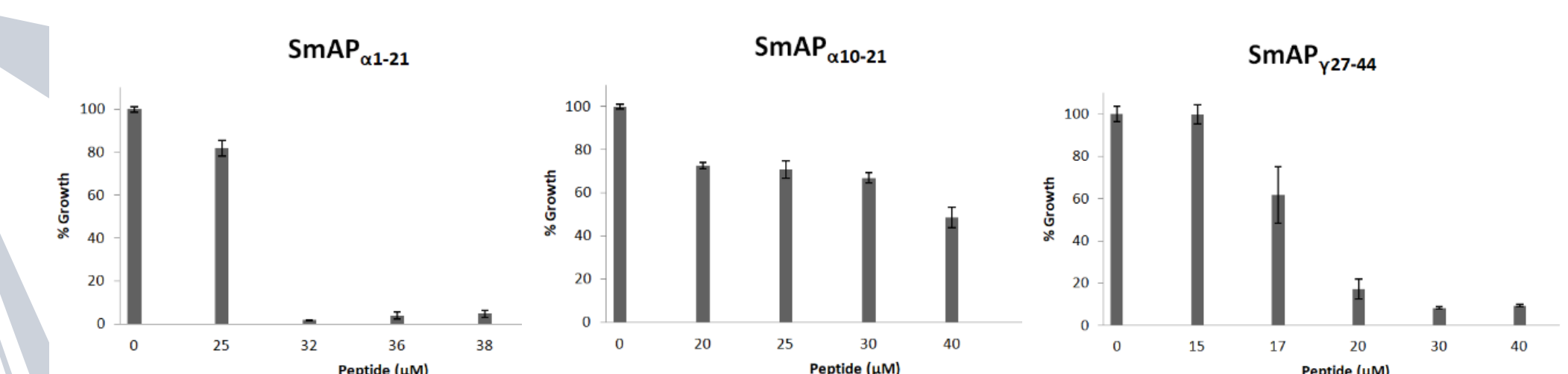
DefSm2-D: KLCEKPSKTFWNGCGNPRHCGDQCKSWEGAVHGACHVWNGRHKMRCYFNCPQAE  
 SmAP $\alpha$ 1-21: KLCEKPSKTFWNGCGNPRHCG  
 SmAP $\alpha$ 10-21: WFGNGNPRHCG  
 SmAP $\gamma$ 27-44: WEGAVHGACHVWNGRHKMRCYFNCPQAE  
 SmAP $\gamma$ 29-34: GAVHGAC



**Secuencia y localización de los péptidos diseñados en la secuencia y la estructura tridimensional de DefSm2-D.** Se muestra también un esquema con la estructura secundaria de DefSm2-D. El  $\alpha$ -core se encuentra subrayado con línea continua y el  $\gamma$ -core subrayado con línea punteada. La localización de los péptidos diseñados se muestra en color rosa en la estructura tridimensional de DefSm2-D.



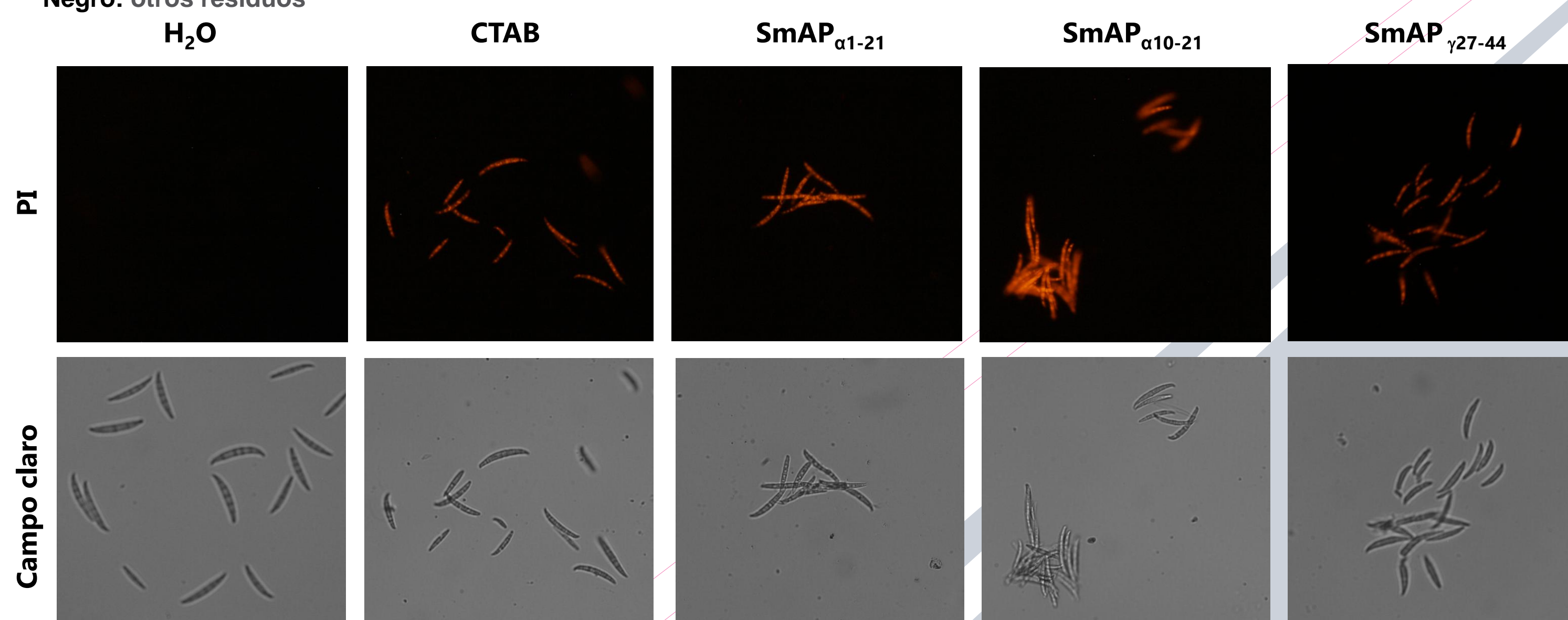
Curvas de crecimiento de *Fusarium graminearum* en 1/2 PDB en presencia de agua (control de crecimiento-CC) o los péptidos sintetizados en distintas concentraciones.



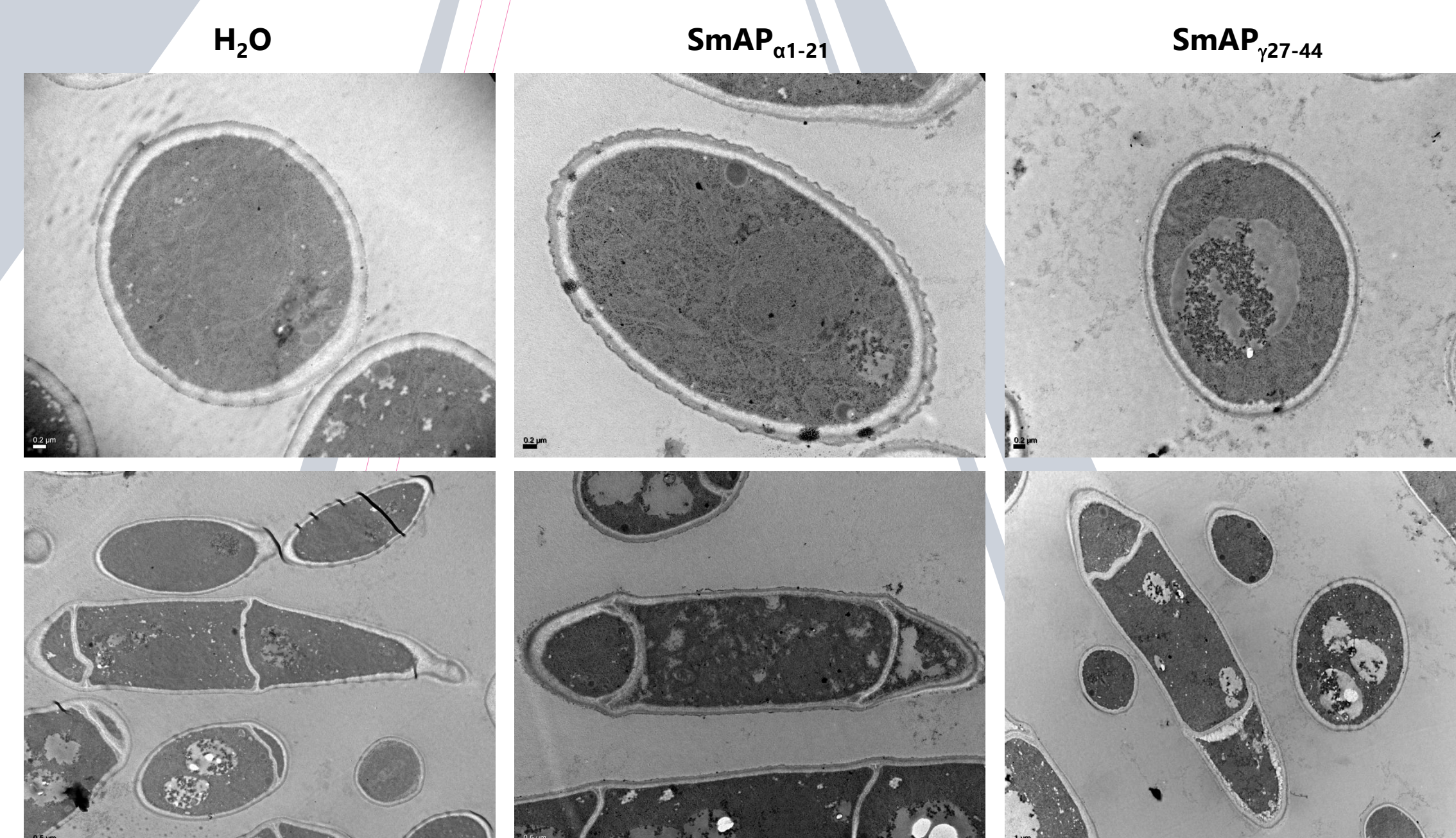
Porcentaje de crecimiento de *F. graminearum* en presencia de distintas concentraciones de los péptidos. El porcentaje (%) de crecimiento se expresa en relación al control de crecimiento.

Péptido	Nombre	Peso molecular (Da)	pI
KLCEKPSKTFWNGCGNPRHCG	SmAP $\alpha$ 1-21	2361.7	8,98
WFGNGNPRHCG	SmAP $\alpha$ 10-21	1346.5	8,24
WEGAVHGACHVWNGRHKMRCYFNCPQAE	SmAP $\gamma$ 27-44	1991.3	8,09
GAVHGAC	SmAP $\gamma$ 29-34	613.9	6,73

Azul: residuos positivos  
 Rojo: residuos negativos  
 Verde: residuos hidrofóbicos sin carga  
 Negro: otros residuos



Permeabilización de la membrana de conidios de *Fusarium graminearum* por la exposición durante 1 h a los péptidos y CTAB (cetrimide)-control positivo; en comparación con agua-control negativo.



Microscopía Electrónica de Transmisión de los macroconidios de *Fusarium graminearum* en presencia de los péptidos más activos. Se realizó una incubación de 1 h con agua (control negativo) o los péptidos.

## Conclusiones

- ✓ Se diseñaron y sintetizaron cuatro péptidos potencialmente antifúngicos empleando como plantilla la secuencia de la defensina DefSm2-D de *Silybum marianum*.
- ✓ Tres de esos péptidos, llamados SmAP $\alpha$ 1-21, SmAP $\alpha$ 10-21 y SmAP $\gamma$ 27-44 resultaron ser activos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* a las concentraciones de 32, 70 y 20  $\mu$ M, respectivamente. SmAP $\gamma$ 27-44 presentó actividad fungicida (<30 minutos de exposición) y SmAP $\alpha$ 1-21 redujo el crecimiento en un 99,7%.
- ✓ Los tres péptidos activos tienen la capacidad de permeabilizar la membrana de los conidios de *F. graminearum*, los dos derivados de la región  $\alpha$ -core produjeron la agregación de los conidios en *clusters*.
- ✓ Las imágenes de TEM de secciones transversales y longitudinales de los conidios tratados con los péptidos SmAP $\gamma$ 27-44 y SmAP $\alpha$ 1-21 no mostraron alteraciones en el interior celular en el tiempo ensayado. El péptido SmAP $\alpha$ 1-21, sin embargo, produjo un efecto diferencial sobre la morfología de la pared celular.