



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

CLONACIÓN DEL ADN_c DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO *Ath Thi2.1* DE *Arabidopsis thaliana* EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN PARA CÉLULAS DE MAMÍFERO

TESIS PROFESIONAL

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:
ERIK VILLAGÓMEZ GÓMEZ**

ASESORA: DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE DEL 2006

**El presente trabajo se realizó en el Centro
Multidisciplinario de Estudios en
Biotecnología-Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la
asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una manera muy especial a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y al Dr. Joel Edmundo López Meza, por brindarme la posibilidad de realizar mi tesis y orientarme en el transcurso de esta, además de brindarme su amistad y su confianza.

A José Luis Anaya López, por ser mi mentor y tenerme paciencia, por transmitir sus conocimientos y sus experiencias, por brindarme su amistad y preocuparse de una manera muy especial por el desarrollo de esta tesis.

A Pedro Damián Loeaza Lara, por su colaboración y apoyo de una manera significativa en este proyecto, por alentarme y por su amistad.

A mis padres, M. Guadalupe y J. Guadalupe, por brindarme todo en la vida, “infinitamente gracias”

A mis hermanos, Gerardo, Esperanza, Leticia, M. Lourdes, Raúl, por ser mis amigos, consejeros y por brindarme su apoyo incondicional.

A mis sobrinas Victoria y B. Alain, por su calidez y su ternura.

A Leticia, por ser la estrella que ilumina día con día mi vida “gracias”.

A el grupo académico y estudiantil del CEMEB, por su colaboración y su apoyo en este proyecto.

A todos mis amigos del M3, por hacer más placentera y divertida mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de generación, Luz, Yazmín, Jerónimo, Javier, por brindarme su amistad incondicional durante toda la carrera y ser una parte importante de mi vida.

A mis compañeros y amigos, Luis Fernando, Luis Efrén, Luis Ángel, Luis Roberto, Isaías, Alejandro, Eric, Juan, Raúl y Salvador por su amistad, comprensión y acompañarme en todo momento.

Y a todas las personas que están presentes en mi vida.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
1. Inmunidad innata	4
2. Generalidades de los péptidos antimicrobianos	8
3. Diversidad de los péptidos antimicrobianos	9
4. Mecanismo de acción extracelular de los péptidos antimicrobianos	10
4.1 Modelo de “palo de barril”	11
4.2 Modelo de “tapizado”	12
4.3 Modelo “toroidal”	13
5. Mecanismos intracelulares de los péptidos antimicrobianos	14
6. Péptidos antimicrobianos en plantas	15
7. Tioninas	17
8. Tionina 2.1	18
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
1. Generales	20
2. Específicos	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Estrategia experimental	21
2. ADNc <i>Ath Thi2.1</i>	23
3. Características del vector pTracer-EF/V5-His (Invitrogen)	23
4. Vector pGEM-T	24
5. Digestión de ADN con enzimas de restricción	24
6. Purificación de los fragmentos de ADN por “Gene Clean”	25
7. Ligación de fragmentos de ADN	25

8. Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> ultracompetentes para choque térmico	26
9. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> ultracompetentes por choque térmico	26
10. Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> para electroporación	27
11. Electroporación de células de <i>Escherichia coli</i>	27
12. Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación)	27
13. Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol	28
14. Limpieza de ADN con fenol-cloroformo	28
15. Secuenciación de ADN	29
16. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el ADNc <i>Ath Thi2.1</i> proveniente de <i>A. thaliana</i>	30
17. Reacción de PCR	30
VII. RESULTADOS	32
1. Obtención del inserto <i>Ath Thi2.1</i> de pUC19 con la enzima <i>EcoRI</i>	32
2. Clonación del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> en el sitio <i>EcoRI</i> del vector pTracer-EF/V5-His B	32
3. Amplificación del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> con los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO	35
4. Clonación del producto de amplificación en el vector pGEM-T	35
5. Subclonación del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> en los sitios <i>KpnI</i> - <i>EcoRI</i> del vector pTracer-EF/V5-His B	37
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIÓN	44
X. BIBLIOGRAFÍA	45

Abreviaturas	Significado
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)
HR	Hypersensitive Response (Respuesta hipersensible)
PCD	Program Cell Death (Muerte celular programada)
SAR	System Acquired Resistance (Sistema de resistencia adquirida)
SA	Salicylic Acid (Ácido salicílico)
SIR	System Induced Resistance (Sistema de resistencia inducible)
PR	Pathogenesis Related (Relacionadas con la patogénesis)
TLRs	Toll Like Receptors (Receptores tipo Toll)
LPS	Lipopolisacáridos
IL-1 β	Interleukin-1 β (Interleucina-1 β)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (Factor de necrosis tumoral- α)
NO	Nitric oxide (Óxido nítrico)
IL-1R	Interleukin-1 Receptor (Receptor de interleucina-1)
aa	Aminoácidos
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)
c.b.p	Cuanto baste para
U	Unidad enzimática
rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Etilendiaminotetracético
DMSO	Dimetilsulfóxido
SDS	Duodecil sulfato de sodio

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rutas de transducción de señales en la inmunidad innata de las plantas	5
Figura 2. Rutas de transducción de señales en la inmunidad innata de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Figura 3. Ruta de transducción de señales en la inmunidad innata de mamíferos	7
Figura 4. Mecanismo electrostático de los péptidos antimicrobianos sobre la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas	10
Figura 5. Modelo de “palo de barril”	11
Figura 6. Modelo de “tapizado”	12
Figura 7. Modelo “toroidal”	13
Figura 8. Mecanismo de acción intracelular de los péptidos antimicrobianos	14
Figura 9. Comparación de las estructuras tridimensionales de una defensina de plantas respecto a las de insecto y de mamífero	16
Figura 10. Porciones del péptido antimicrobiano Ath Thi2.1	23
Figura 11. Mapa del vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His (Invitrogen)	24
Figura 12. Digestión de la construcción pUC19–Ath Thi2.1 con la enzima <i>EcoRI</i>	32
Figura 13. Digestión de la construcción pTracer-EF/V5-His B-Ath Thi2.1 (<i>EcoRI</i>), con la enzima <i>EcoRI</i>	33
Figura 14. Secuencia de nucleótidos del ADNc Ath Thi2.1 en la construcción pTracer-EF/V5-His B-Ath Thi2.1 (<i>EcoRI</i>)	34

Figura 15. Producto de amplificación del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> con los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO	35
Figura 16. Confirmación de la construcción pGEM-T- <i>Ath Thi2.1</i>	36
Figura 17. Secuencia de nucleótidos del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> presente en la construcción pGEM-T- <i>Ath Thi2.1</i>	37
Figura 18. Corroboración de la construcción pTracer-EF/V5-His B- <i>Ath Thi2.1</i> , por PRC y doble digestión (<i>KpnI</i> – <i>EcoRI</i>)	38
Figura 19. Presencia de la construcción pTracer-EF/V5-His B- <i>Ath Thi2.1</i> en las colonias 61 y 68.	39
Figura 20. Secuencia de nucleótidos del ADNc <i>Ath Thi2.1</i> presente en la construcción pTracer-EF/V5-His B- <i>Ath Thi2.1</i>	40
Figura 21. Construcción pTracer-EF/V5-His B- <i>Ath Thi2.1</i> .	40

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas y los animales han desarrollado varios mecanismos de defensa contra los microorganismos patógenos. Uno de estos mecanismos es el sistema inmune que desempeña la función fisiológica de proteger al hospedero contra infecciones y eliminar sustancias extrañas (Abbas *et al.*, 2002).

En organismos superiores, particularmente en los mamíferos, el sistema inmune tradicionalmente se ha dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida, donde las principales diferencias radican en los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico (Hernández *et al.*, 2001). La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos (Janeway *et al.*, 2001), así mismo se considera el mecanismo de defensa filogenéticamente más antiguo presente en todos los organismos multicelulares (Boulanger *et al.*, 2002). En contraposición con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida presenta mecanismos de defensa más evolucionados, como lo es, la especificidad de macromoléculas, la capacidad para “recordarlas” y responder con una mayor intensidad tras cada exposición a las mismas (Abbas *et al.*, 2002).

Las plantas son capaces de resistir el ataque por patógenos, respondiendo con una defensa local o sistémica que previene o reprime la infección, proporcionando resistencia a subsecuentes infecciones por el mismo patógeno u otros relacionados. El patógeno provoca respuestas rápidas como: un flujo de iones, activación de las cascadas de cinasas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), en tanto que la respuesta de defensa tardía provoca: la inducción de la respuesta hipersensible (HR, del inglés Hypersensitive Response), una forma localizada de muerte celular programada (PCD, del inglés Program Cell Death) delimitada por la extensión del patógeno, seguida de un refuerzo de las paredes celulares, y producción de compuestos antimicrobianos como las proteínas de defensa y fitoalexinas (Montesano *et al.*, 2003).

Las plantas y los animales comparten mecanismos básicos de defensa inespecíficos que constituyen la primera barrera contra los patógenos, como lo es

la producción de péptidos antimicrobianos (Anaya-López *et al.*, 2005). Estos poseen una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos e incluso virus (Thevissen *et al.*, 1996).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas compuestas de aminoácidos (aa) anfipáticos, catiónicos y de dimensiones que permiten la interacción específica de las regiones catiónicas de los péptidos antimicrobianos con la carga negativa de los grupos polares de los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática, lo que les permite fijarse e insertarse en la bicapa de fosfolípidos, formando poros o canales transmembranales que ocasionan la salida del contenido citoplasmático o bien el flujo de iones específicos (Anaya-López *et al.*, 2005; Brogden, 2005).

Arabidopsis thaliana expresa constitutivamente el péptido antimicrobiano Ath Thi2.1 (Tionina 2.1 de *A. thaliana*), en flores, vainas y hojas. Sin embargo, presenta una regulación inducible cuando se desarrollan infecciones secundarias, propiciando la resistencia en contra de *Fusarium sp*, *F. oxysporum* y *F. matthiolae*, alterando el crecimiento fúngico de estos (Zasloff, 2002).

La defensa del hospedero contra las infecciones ha sido asistida por el uso de antibióticos; sin embargo, el uso excesivo de los mismos en el tratamiento de infecciones animales ha propiciado la resistencia microbiana, provocando así un problema clínico. Es por ello que se continúa con la búsqueda de nuevos antibióticos que presenten actividad *in vitro*, rápida acción, amplio espectro, que no induzcan resistencia y que tengan sitios limitados de acción (Brogden *et al.*, 2003).

Los péptidos antimicrobianos de origen natural son buenos candidatos debido a que se encuentran en la naturaleza como un mecanismo común de defensa del hospedero (Kaiser *et al.*, 2000). Estos, tienen efectos en bajas concentraciones, (Brogden *et al.*, 2003), poseen una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos e incluso virus (Thevissen *et al.*, 1996) y también presentan actividad sinérgica con antibióticos convencionales, pudiendo así brindar una posible solución para el

tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos convencionales (Brogden *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se cita el primer reporte sobre la clonación del ADNc *Ath Thi2.1* en el vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His B, dicha construcción permitirá obtener el péptido antimicrobiano como una proteína de fusión en las líneas celulares que vayan a ser transfectadas.

II. MARCO TEÓRICO

1. Inmunidad innata

La inmunidad innata (también denominada inmunidad natural o nativa) (Abbas *et al.*, 2002), constituye la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, siendo considerada como el mecanismo de defensa filogenéticamente más antiguo, ya que está presente en todos los organismos multicelulares, incluyendo las plantas y los animales (Janeway *et al.*, 2001). Los mecanismos de la inmunidad innata están presentes antes de desarrollarse la infección (Boulanger *et al.*, 2002) y pueden reaccionar básicamente de la misma manera a infecciones recurrentes (Abbas *et al.*, 2002).

Las células de las plantas cuentan con una gran número de receptores que reconocen moléculas producidas o relacionadas con el patógeno (oligosacáridos, péptidos, proteínas y lípidos, entre otros) (Montesano *et al.*, 2003). Los receptores son activados por las moléculas de los patógenos, que producen la liberación o activación de diversas sustancias efectoras (Oppenheim *et al.*, 2003) y de esta manera modulan la expresión de genes involucrados en procesos de defensa (Lee y Howe, 2003).

Las plantas cuentan con dos vías principales de señalización implicadas en la defensa. Por una parte se encuentra el sistema de resistencia adquirida (SAR, del inglés System Acquired Resistance), donde una necrosis local o PCD se lleva a cabo por una HR, producida por virus, hongos o bacterias. La HR dispara un incremento local de ácido salicílico (SA, del inglés Salicylic Acid) y la acumulación de una señal móvil. La señalización induce la acumulación sistémica de SA y ácido metil-salicílico volátil, que provoca la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis en las partes no afectadas de la planta (Wick, 2002). Por otro lado, se encuentra el sistema de resistencia inducible (SIR, del inglés System Induced Resistance), donde se provoca la lignificación de la pared celular, impidiendo que los patógenos penetren o dañen las células no infectadas. La producción de fitoalexinas (compuestos fenólicos, terpenoides y ácidos grasos) después de la infección puede inhibir el crecimiento del patógeno y proteger a la planta contra infecciones secundarias por otro patógeno relacionado. Otra reacción del SIR por

la planta durante la infección, es la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, del inglés Pathogenesis Related), que pueden inhibir el crecimiento del patógeno, el SIR es independiente del SA (Epple *et al.*, 1995; Hilpert *et al.*, 2001; Montesano *et al.*, 2003; Vignutelli *et al.*, 1998; Wick, 2002).

Estudios recientes demuestran que existe una similitud entre el mecanismo de defensa inducido por los activadores de la inmunidad innata de las plantas y los animales. Un ejemplo de esto es la analogía estructural del receptor FLS2 presente en *Arabidopsis*, que interactúa con un dominio conservado de los flagelos presentes en eubacterias (Figura 1), con los receptores Toll de *Drosophila* (Figura 2) y los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés Toll Like Receptors) de mamíferos, involucrados en mediar la respuesta inmune innata en los animales (Figura 3) (Montesano *et al.*, 2003).

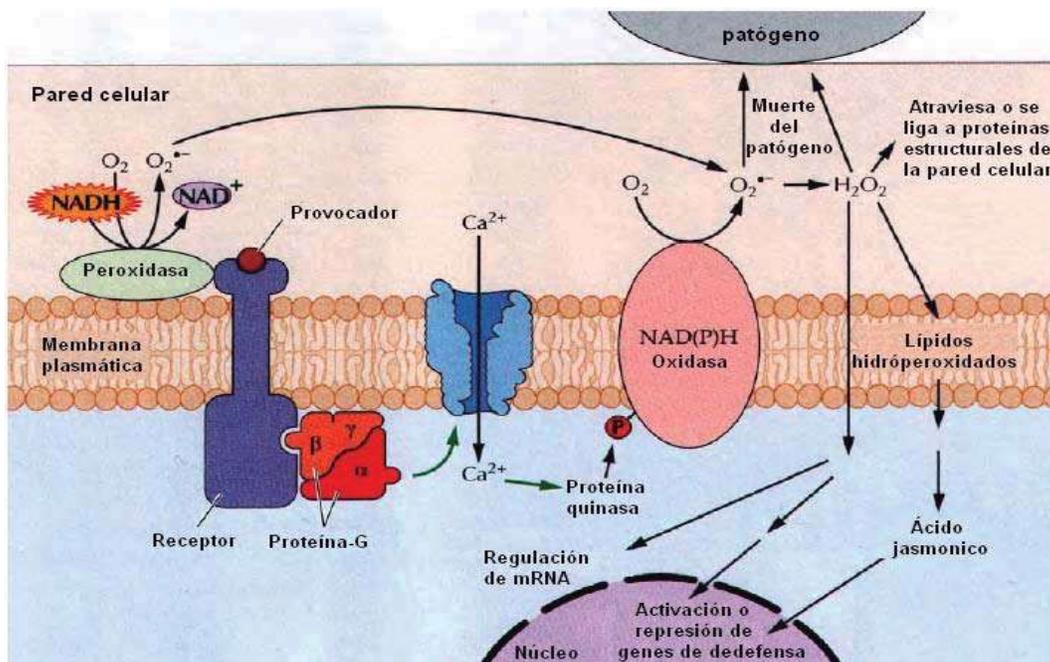


Figura 1. Rutas de transducción de señales en la inmunidad innata de las plantas. La presencia de un patógeno provoca la formación de superóxido por NAD(P)H oxidasa y peroxidasa, conocido como explosión oxidativa. El superóxido puede ser transformado en intermediarios reactivos de oxígeno que dispara la expresión de genes de defensa, incluyendo péptidos antimicrobianos (Wick, 2002).

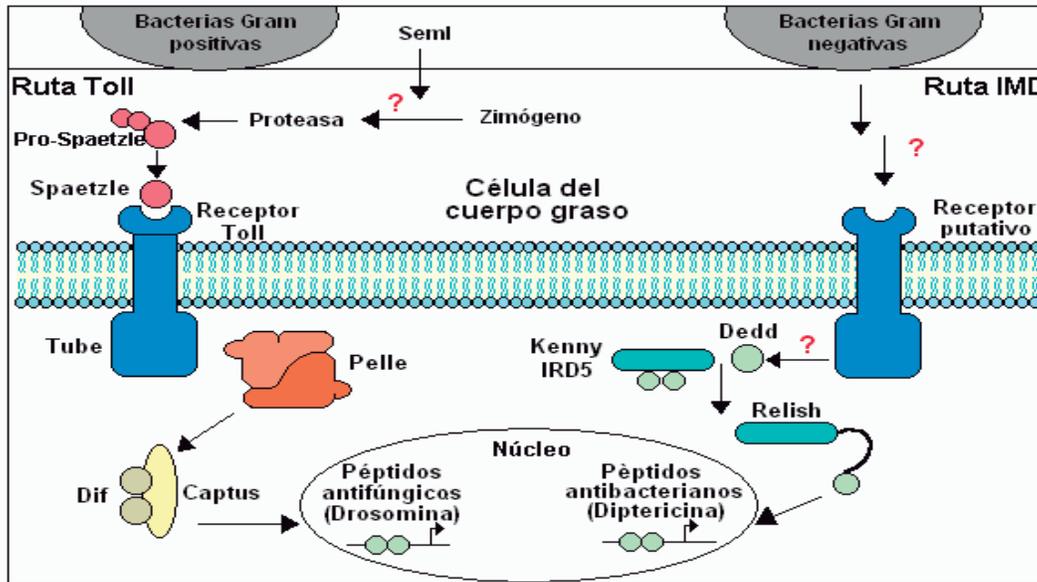


Figura 2. Rutas de transducción de señales en la inmunidad innata de *Drosophila melanogaster*. La proteína Seml que circula en la hemolinfa de *D. melanogaster*, se une al peptidoglucano. Seml interactúa con el zimógeno de Pro-Spaetzle, esta asociación (posiblemente) es reconocida por una proteasa, la cual rompe el zimógeno y libera el precursor Pro-Spaetzle de la proteína Spaetzle, esta proteína interactúa con el TLR, el cual está asociado con una proteína llamada Tube, que activa una serina-treonina cinasa llamada Pelle, que degrada a Cactus, dicha degradación produce la translocación de Dif en el núcleo, activando la transcripción de péptidos antifúngicos como la drosomicina. Los TLRs que presentan una mutación, pueden propiciar la expresión de péptidos antimicrobianos como la cecropina y dipterericina, por medio de la ruta IMD, que es activada por una proteína relacionada a Dif llamada Relish (Kaisho y Akira, 2001; Zasloff, 2002).

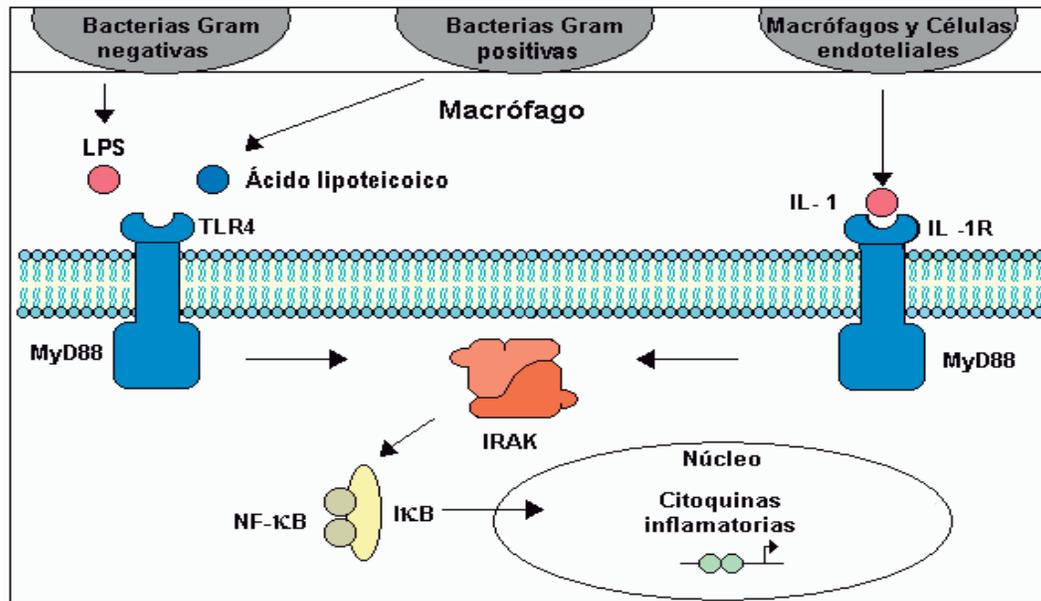


Figura 3. Ruta de transducción de señales en la inmunidad innata de mamíferos. La expresión de péptidos antimicrobianos es estimulada por los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las bacterias Gram negativas, los ácidos lipoteicoicos presentes en las bacterias Gram positivas, la interleucina-1 β (IL-1 β , del inglés Interleukin-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés Tumor Necrosis Factor- α), presentes antes del desarrollo de la infección. Los LPS al interactuar con los macrófagos, pueden activar la producción de TNF- α , IL-12, y sustancias inflamatorias como el óxido nítrico (NO, del inglés Nitric Oxide). Los receptores más importantes relacionados con el reconocimiento del patógeno son el receptor TLR4, que reconoce LPS y ácidos lipoteicoicos, y el receptor de interleucina-1 (IL-1R, del inglés Interleukin-1 Receptor). Estos receptores están asociados a la proteína llamada MyD88 que mantiene una estructura molecular conservada con la proteína Tube de *Drosophila*, la cual activa a IRAK (una proteína similar a Pelle), presente en *Drosophila*, así como a las proteínas I κ B y NF- κ B, que corresponden a Cactus y a Dif, respectivamente (Abbas *et al.*, 2001; Kaisho y Akira, 2001; Zasloff, 2002).

2. Generalidades de los péptidos antimicrobianos

Las plantas y los animales comparten mecanismos básicos de defensa inespecíficos que constituyen la primera barrera contra los patógenos, como la producción de péptidos antimicrobianos (Anaya-López *et al.*, 2005). Estos poseen una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos e incluso virus (Thevissen *et al.*, 1996).

Los péptidos antimicrobianos forman grupos diversos y abundantes de moléculas ampliamente distribuidas en plantas y animales, lo que sugiere que desempeñan una función importante en la evolución de los organismos multicelulares complejos. Estos péptidos difieren en la secuencia de aa, así como en su estructura, tamaño (tienen de 12 a 50 aa) y carga, siendo la mayoría aniónicos o catiónicos, aunque también los hay neutros. Los péptidos antimicrobianos están compuestos de aa anfipáticos, catiónicos y de dimensiones que permiten la interacción específica de las regiones catiónicas del péptido antimicrobiano con la carga negativa de los grupos polares de los fosfolípidos aniónicos (fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, cardiolipina y LPS) de la membrana plasmática, lo que le permite fijarse e insertarse en la bicapa de fosfolípidos, formando poros o canales transmembranales que ocasionan la salida del contenido citoplasmático o bien el flujo de iones específicos (Anaya-López *et al.*, 2005; Brogden, 2005).

La interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas se ha evaluado principalmente con los péptidos catiónicos con estructura de hélice- α y aunque el mecanismo de interacción puede ser diferente para cada tipo de péptido, su principal acción involucra la formación de poros o canales. Estos mecanismos se explican en los modelos de “palo de barril”, “toroidal” y “tapizado” (Anaya-López *et al.*, 2005) Sin embargo, la formación de poros transmembranales no es el único mecanismo de acción para eliminar a los microorganismos. Algunas evidencias sugieren que la internalización de los péptidos puede alterar la formación de la membrana citoplasmática, inhibir la síntesis de la pared celular, de los ácidos nucleicos, y de las proteínas, o modificar la actividad de algunas enzimas (Brogden, 2005).

3. Diversidad de los péptidos antimicrobianos

La clasificación de los péptidos antimicrobianos se basa principalmente en sus características estructurales y bioquímicas (Vizioli y Sazet, 2002), como lo son: 1) el tipo de aa que los componen (Anaya-López *et al.*, 2005); 2) la homología de la secuencia (Brogden *et al.*, 2003; Sarmafilk, 2002); 3) la carga (Anaya-López *et al.*, 2005; Brogden *et al.*, 2003); 4) la estructura secundaria que adoptan (Anaya-López *et al.*, 2005); 5) la estructura tridimensional (Brogden, 2005; Clark *et al.*, 2005; Hegyi y Gerstein, 1999; Oppenheim *et al.*, 2005; Sarmafilk, 2002); 6) similitudes funcionales (Brogden *et al.*, 2003; Sarmafilk, 2002); y 7) por su modo de acción (De Lucca y Walsh, 1999). La Tabla 1 presenta la clasificación de los péptidos antimicrobianos en base a las similitudes funcionales y a su carga.

Tabla 1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos			
GRUPO	PÉPTIDOS	ORIGEN	ACTIVIDAD
Péptidos aniónicos	Dermacidina	Humano	Bacterias
	Enkelitina	Humano y bovino	Bacterias
	Péptido B	Humano y bovino	Bacterias
Péptidos catiónicos lineales, hélice- α	Cecropina	Insecto y cerdo	Bacterias, hongos virus, protozoarios
	Magainina	Anfibios	Bacterias y protozoarios
	Buforinas	Anfibios	Bacterias y hongos
Péptidos catiónicos lineales ricos en cierto aminoácido	Histatina (rica en His) Indolisina (rica en Try)	Humano Ganado	Bacterias y hongos Bacterias
	Dipterisina (rica en Gly) Drosocina (rica en Pro)	Dípteros Mosca de fruta	Bacterias Bacterias
Péptidos catiónicos con un puente disulfuro	Brevinina	Rana	Bacterias
	Tanatina	Hemíptero	Bacterias y hongos
	Bactenecina	Invertebrados	Bacterias
	Esculentina	Vertebrados	Bacterias y hongos
Péptidos catiónicos con dos o más puentes disulfuro (estructura de hoja- β)	α y β Defensinas	Mamíferos	Bacterias y hongos
	Tioninas	Plantas	Bacterias y hongos
	Protegrina I	Cerdo	Bacterias, hongos y virus
Dipéptidos aromáticos	Ciclotidinas	Plantas	Bacterias, hongos, virus, antitumoral
	N-B-alanin- 5-S-glutatinil 3,4-dihibroxifenilalanina P-hidroxycinnamaldeido	<i>Sarcophaga peregrina</i> <i>Acantholyda parki</i>	Bacterias y hongos Bacterias y hongos
Péptidos derivados de proteínas	Lactoferrina	Humano	Bacterias y virus
	Derivados de hemoglobina	Garrapatas	Bacterias

(Basada en Anaya-López *et al.*, 2005; Broekaert *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2005 ; Myard *et al.*, 2002 ; Sarmafilk, 2002; Vizioli y Sazet, 2002)

4. Mecanismo de acción extracelular de los péptidos antimicrobianos

El mecanismo de acción extracelular de los péptidos antimicrobianos no ha sido totalmente definido (Brogden, 2005), es por ello que se han planteado varias hipótesis, entre ellas: i) la despolarización de las membranas bacterianas; ii) la creación de poros que provocan el escape del contenido celular y iii) la activación de procesos apoptóticos, como la inducción de hidrolasas que degradan la pared celular (Zasloff, 2002). Los modelos más aceptados que nos ayudan a entender el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos son: el modelo de “palo de barril”, el modelo de “tapizado” y el modelo “toroidal” (Anaya-López *et al.*, 2005; Brogden, 2005). Estos modelos coinciden en el hecho de que los péptidos antimicrobianos (aniónicos o catiónicos) primero son atraídos a la superficie de las bacterias (Gram negativas o Gram positivas), a la que se unen por un mecanismo electrostático (Figura 4) (Brogden, 2005).

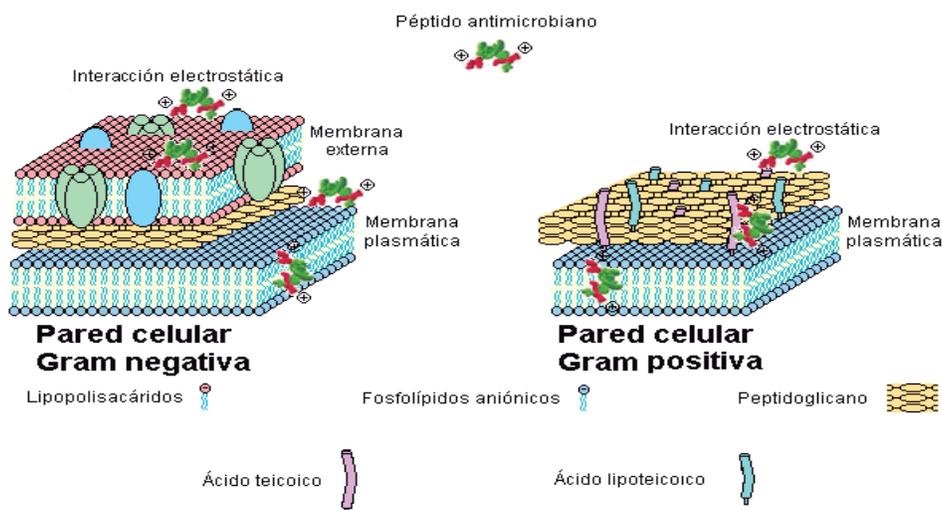


Figura 4. Mecanismo electrostático de los péptidos antimicrobianos sobre la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los péptidos antimicrobianos catiónicos son atraídos por las cargas negativas del exterior de las bacterias (fosfolípidos aniónicos y grupos fosfato de los LPS en las bacterias Gram negativas y el ácido teicoico en las bacterias Gram positivas). Una vez que los péptidos están en la superficie microbiana deben atravesar los lipopolisacáridos de la membrana en las bacterias Gram negativas, en tanto, que en las bacterias Gram positivas deben atravesar los ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos, antes que puedan interactuar con la membrana plasmática de las bacterias (Brogden, 2005).

4.1 Modelo de “palo de barril”

En este modelo (Figura 5), los péptidos se agrupan sobre la membrana, formando una estructura con forma de “barril” compuesto de péptidos helicoidales como duelas, donde la región hidrofóbica de los péptidos se alinea con la región central de la bicapa lipídica, y la región hidrofílica de los péptidos forma la región interna del poro (Brogden, 2005).

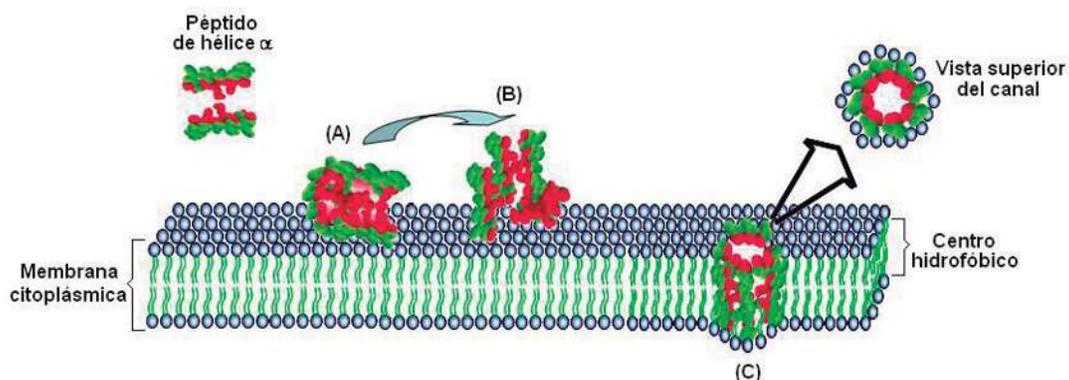


Figura 5. Modelo de “palo de barril”. **A)** Las regiones hidrofílicas de los péptidos (en rojo) interactúan entre sí sobre la superficie de la membrana plasmática para formar un complejo. **B)** Los péptidos se orientan perpendicularmente al plano de la membrana plasmática. **C)** La región hidrofóbica de los péptidos interactúa con la región hidrofóbica de la bicapa, mientras que la región hidrofílica del péptido se orienta hacia el interior, formando así un canal (Tomado de Anaya-López *et al.*, 2005).

4.2 Modelo de “tapizado”

En este modelo (Figura 6), los péptidos catiónicos son atraídos electrostáticamente a los grupos aniónicos de los fosfolípidos, cubriendo la superficie de la membrana plasmática como un tapiz, produciendo así, micelas y el colapso de la membrana (Brogden, 2005).

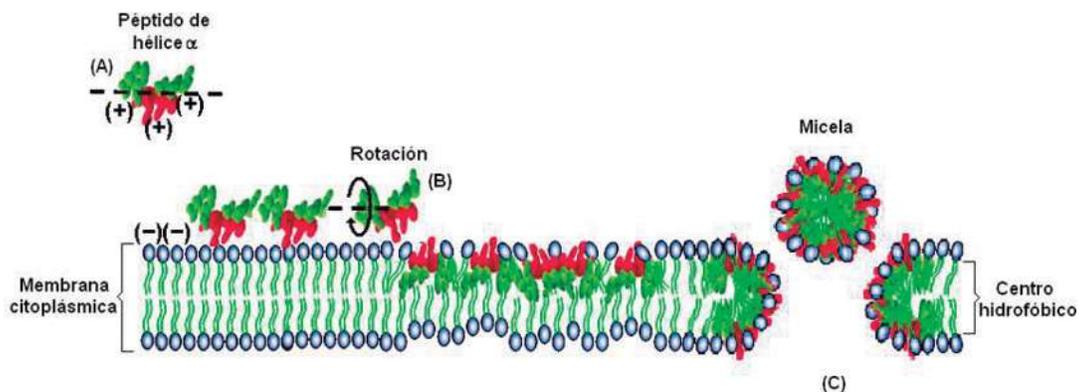


Figura 6. Modelo de “tapizado”. **A)** Interacción de las cargas catiónicas de los péptidos antimicrobianos con las cargas negativas de la cabeza polar de los fosfolípidos. **B)** Cuando el péptido alcanza una concentración crítica, los monómeros rotan y se reorientan hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana plasmática. **C)** Producción de micelas y colapso de la membrana plasmática (Tomado de Anaya-López *et al.*, 2005).

4.3 Modelo “toroidal”

En este modelo (Figura 7), los péptidos antimicrobianos helicoidales se insertan dentro de la membrana e inducen la curvatura de la monocapa lipídica, de manera que la región hidrofílica del centro es cubierta por la cara polar de los péptidos asociados a la cabeza polar de los grupos lipídicos (Brogden, 2005).

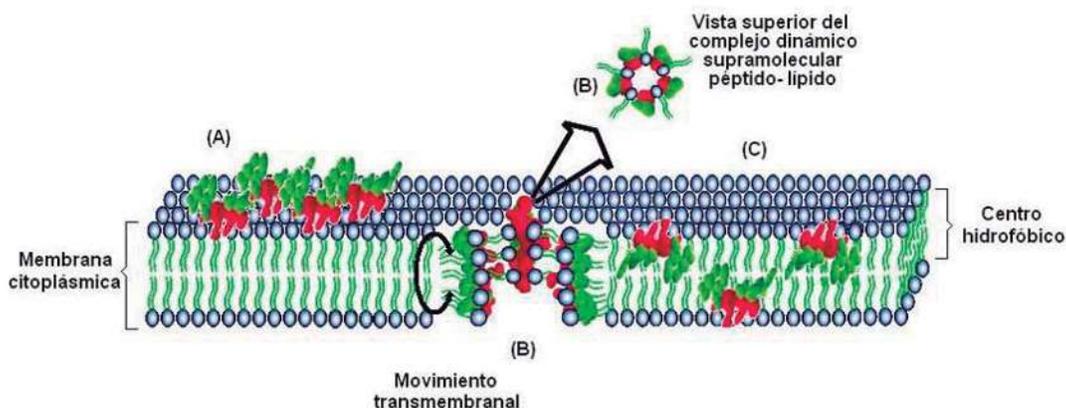


Figura 7. Modelo “toroidal”. **A)** Los péptidos se orientan de forma paralela al plano de la bicapa. **B)** Cuando se alcanza una concentración crítica, las moléculas del péptido se reorientan perpendicularmente, penetrando la región hidrofóbica de la bicapa, formando un complejo péptido-lípido, este complejo produce la ruptura irreversible en la membrana plasmática y un incremento en el “movimiento transmembranal” de lípidos (flecha de dos cabezas), **C)** Produciendo que el péptido pueda orientarse a la capa interna de la bicapa (Tomado de Anaya-López *et al.*, 2005).

5. Mecanismos intracelulares de los péptidos antimicrobianos

Además de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos que involucran la formación de canales iónicos, poros transmembranales y la ruptura de la membrana celular; existen evidencias que indican que los péptidos antimicrobianos interactúan con moléculas intracelulares (Brogden, 2005). La Figura 8 muestra algunos ejemplos de la interacción de los péptidos antimicrobianos con moléculas intracelulares.

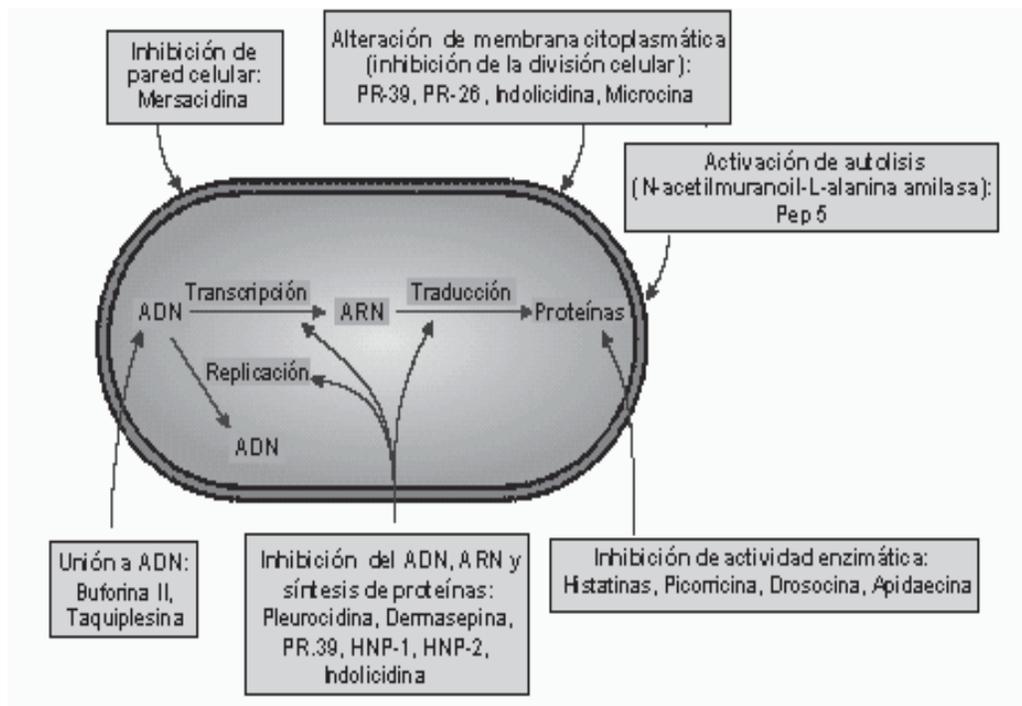


Figura 8. Mecanismos de acción intracelular de los péptidos antimicrobianos. Una vez que los péptidos antimicrobianos atraviesan la membrana plasmática de las bacterias (Gram positivas o Gram negativas), éstos alcanzan blancos intracelulares, como lo son: el ADN, ARN y las proteínas en los procesos de replicación, transcripción y traducción, alterando de esta manera la formación de la membrana plasmática, inhibiendo la síntesis de la pared celular, así como la inhibición de ácidos nucleicos, proteínas y de algunas enzimas. En esta figura se muestran los principales blancos intracelulares en *Escherichia coli* (Tomado de Brogden, 2005).

6. Péptidos antimicrobianos en plantas

Las plantas tienen un mecanismo de defensa activado en respuesta al ataque de los patógenos (García *et al.*, 2001). Al igual que los animales, las plantas expresan péptidos antimicrobianos (Zasloff, 2002), que pueden ser constitutivos o inducidos en respuesta a una infección por patógenos y otros tipos de estrés (Segura *et al.*, 1998; Zasloff, 2002). Los péptidos antimicrobianos de las plantas se caracterizan por presentar estructuras globulares, ser ricos en cisteína y tener cuatro o más puentes disulfuro, que le proporcionan estabilidad a las hojas- β y a las hélices- α (García *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 1998).

Entre las familias de péptidos antimicrobianos descritos en plantas (Tabla 2), se encuentran las tioninas, que fueron los primeros péptidos antimicrobianos que mostraron actividad contra patógenos de plantas *in vitro*. Subsecuentemente, varias familias de péptidos ricos en cisteína han sido caracterizadas, incluyendo a las defensinas de plantas que son estructuralmente similares a las defensinas de insectos y de mamíferos (Figura 9) (García *et al.*, 2001). Sin embargo, las defensinas de insectos carecen del dominio correspondiente al amino terminal de la hoja- β . Las defensinas de plantas y mamíferos carecen de la estabilidad proporcionada por las cisteínas en la hélice- α (Thevissen *et al.*, 1996).

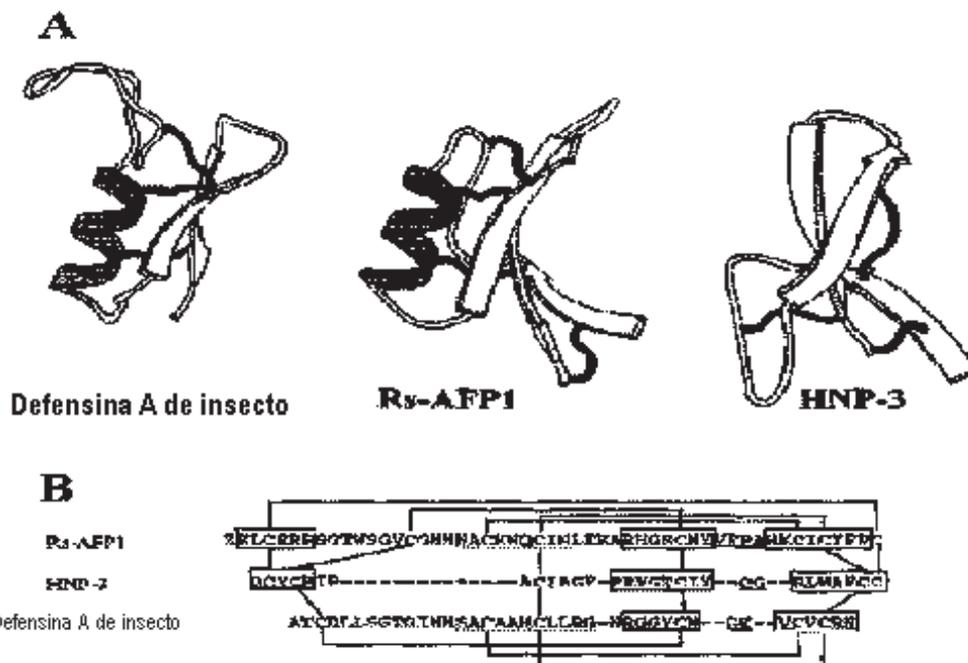


Figura 9. Comparación de las estructuras tridimensionales de una defensina de plantas respecto a las de insecto y de mamífero. A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de una defensina de planta (Rs-AFP1), una defensina de insecto (defensina A) y una defensina de mamífero (HNP-3). La hoja- β es representada por una flecha blanca, la hélice- α por una hélice negra, y los enlaces bisulfuro por líneas negras. **B)** Comparación de la secuencia de aa, enlaces bisulfuro y elementos de la estructura secundaria de las defensinas, los espacios introducidos son para el óptimo alineamiento de las tres defensinas (indicados por rayas), la secuencia en los cuadros representan la hoja- β y la secuencia subrayada representa el giro β , las secuencias subrayadas con una línea punteada corresponde a la hélice- α . Los enlaces bisulfuro son indicados por las líneas que unen las cisteínas (Tomado de Broekaert *et al.*, 1995).

Los péptidos antimicrobianos de plantas inhiben el desarrollo de un amplio rango de hongos a concentraciones micromolares (Thevissen *et al.*, 1996), al parecer por la permeabilización de la membrana plasmática a través de la unión del péptido antimicrobiano a un receptor putativo (Segura *et al.*, 1998). En adición a la formación de poros, los péptidos antimicrobianos de plantas reducen la elongación de la hifa, provocando la distorsión de la morfología (De Lucca y Walsh, 1999). Dichos péptidos no presentan toxicidad a las células de mamíferos (Thevissen *et al.*, 1996).

Tabla 2. Péptidos antimicrobianos de plantas				
FAMILIA	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	ENLACES DISULFURO	TIPO Y SUBFAMILIA	ACTIVIDAD CONTRA
LTPs	90–95	3–4	I–II	Bacterias y hongos
Esnacinas	61–70	6	I–III	Bacterias y hongos
Defensinas	45–54	4	I–IV	Bacterias y hongos
Tioninas	45–47	3–4	I–IV	Bacterias y hongos
Hevein-like	43	4	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Knottin-like	36–37	3	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Shepherdinas	28–38	0 (lineal)	I–II	Bacterias y hongos
MBP-1	33	2	I	Bacterias y hongos
Péptidos macrocíclicos	29–31	3	I–III	Bacterias Gram (+)
Ib-AMPs	20	2	I	Bacterias Gram (+) y hongos

(Tomada de García-Olmedo *et al.*, 2001)

7. Tioninas

Además de las defensinas, las plantas producen tioninas que están implicadas en la protección de la planta contra fitopatógenos. Esta clase de péptidos, encontrados en varios tejidos de las plantas, como lo es el endospermo de la semilla, el tallo y las raíces, presentan una estructura tridimensional que puede ser representada por la letra gamma (Γ), donde la porción vertical consiste en un par de hélices- α antiparalelas y el brazo horizontal corto consiste en una lamina- β antiparalela (Thevissen *et al.*, 1996).

Las tioninas pertenecen a un grupo pequeño de péptidos básicos (Zasloff, 2002), ricos en cisteína (Vignutelli *et al.*, 1998) que son tóxicas para bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos, levaduras y varios tipos de células cancerígenas. Se ha propuesto que la toxicidad requiere de la interacción electrostática de las tioninas con las cargas negativas de la membrana, provocando así la formación de poros en la membrana (Thevissen *et al.*, 1996).

8. Tionina 2.1

Arabidopsis thaliana es una de las plantas modelo para la investigación y el desarrollo genómico (Nicholas *et al.*, 2002). Se han identificado dos genes, *Ath Thi2.1* y *Ath Thi2.2*, los cuales presentan una identidad del 71% entre ellos con respecto a la región codificante. Ambos genes codifican péptidos antimicrobianos (Tionina 2.1 (Thi2.1) y Tionina 2.2 (Thi2.2)), que cuentan con 6 residuos de cisteína en posiciones homólogas, son básicos y tienen un residuo de tirosina en la posición 13, presentando una identidad del 53% a nivel de proteína (Epple *et al.*, 1995).

Estos dos genes presentan una regulación diferente. El gen *Ath Thi2.2* se expresa constitutivamente en el tallo, a diferencia del gen *Ath Thi2.1* que se expresa constitutivamente en el tejido epitelial de flores y vainas, y es inducible en el tallo cuando se desarrollan infecciones secundarias. La inducción puede ser provocada por fitopatógenos (bacterias y hongos) o proteínas PR, además de sustancias químicas como: el nitrato de plata y el ácido jasmónico. Se ha demostrado que la sobreexpresión de *Ath Thi2.1* aumenta la resistencia en contra de *Fusarium sp.*, *F. oxysporum*, *F. matthiola* y altera el crecimiento fúngico (Epple *et al.*, 1995; Vignutelli *et al.*, 1998; Zasloff, 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

El aumento en el número de pacientes inmunocomprometidos, así como la resistencia antimicrobiana a tratamientos convencionales, ha propiciado un incremento en las infecciones sistémicas causadas por hongos, de las cuales el principal agente causal es *Candida albicans*. Esto ha fomentado el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos oportunistas. Los péptidos antimicrobianos naturales y los análogos sintéticos de éstos, han sido reconocidos como compuestos con un potencial significativo para el tratamiento contra patógenos humanos. Numerosos estudios muestran la sensibilidad de *C. albicans* a una gran variedad de péptidos antimicrobianos, tanto de origen animal como de origen vegetal *in vitro* (De Lucca y Walsh, 1999; Yrã *et al.*, 2001). Sin embargo, hoy en día no existe ninguna evidencia que demuestre que Thi2.1, tiene actividad antifúngica contra hongos patógenos de mamíferos como *C. albicans*.

La posibilidad de introducir ADN exógeno en células en cultivo ha permitido estudiar detalladamente las funciones y el control de la expresión de los genes (Castro y Portelles, 1997). Hoy en día, una gran cantidad de genes exógenos han sido exitosamente introducidos y expresados en células eucariotas, empleando una variedad de construcciones, vectores virales y promotores específicos de tejidos eucarióticos (Ravid y Freshney, 1998).

La habilidad de transferir ADN exógeno dentro de células de mamífero *in vitro*, ha sido utilizada en los últimos años por la industria biotecnológica para la generación de biofármacos (Ravid y Freshney, 1998), es por ello, que la posibilidad de expresar el gen *Ath Thi2.1* en células de mamífero, por medio del uso de vectores de expresión celular, permitirá estudiar los efectos de estos péptidos en contra de organismos patógenos de mamíferos como *C. albicans*.

IV. HIPÓTESIS

El ADNc *Ath Thi2.1* de *A. thaliana* clonado en el vector de expresión pTracer-EF/V5-His B, es expresado como una proteína de fusión en líneas celulares de mamífero.

V. OBJETIVOS

1. General

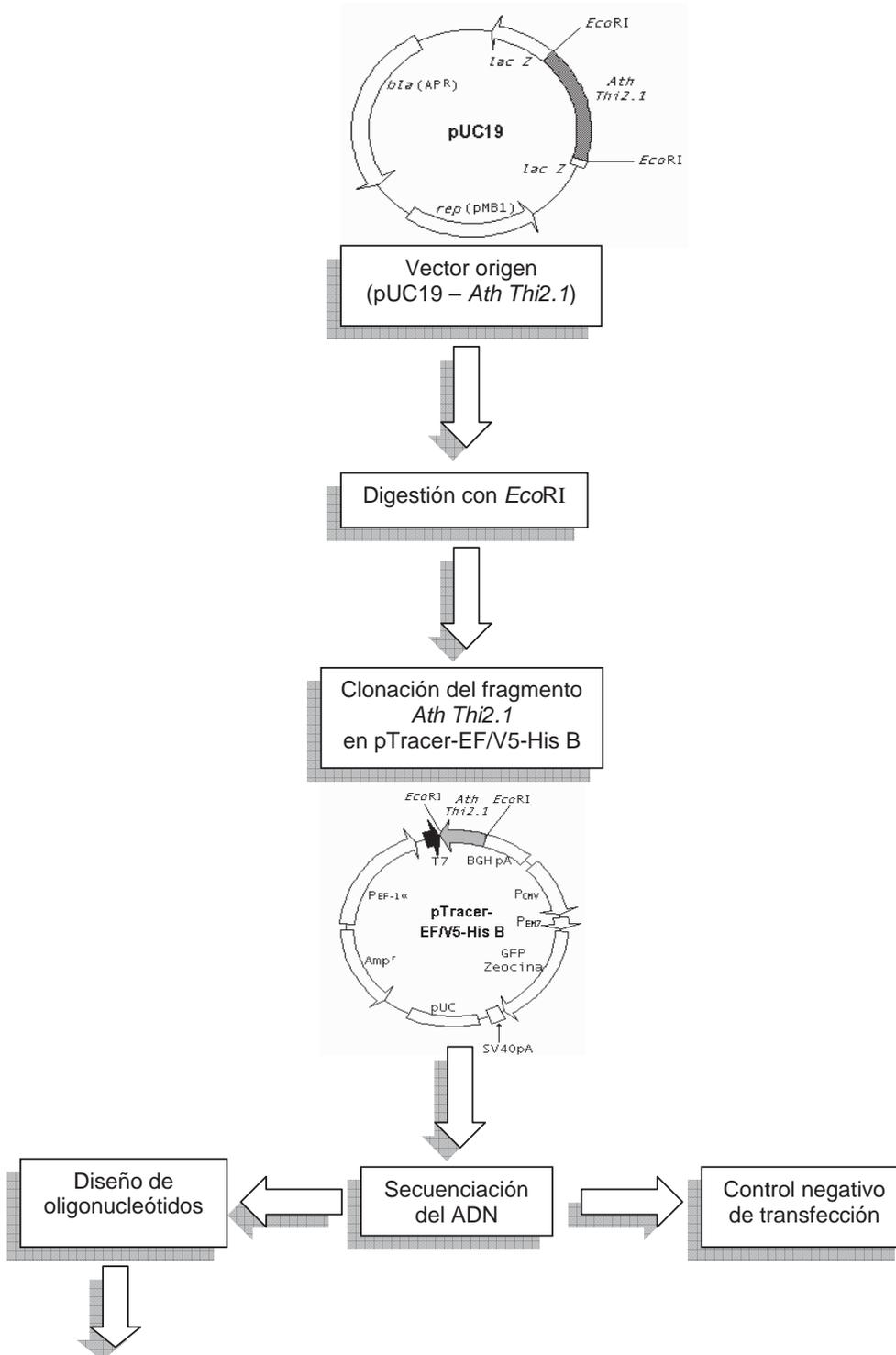
Obtener un vector de expresión para células de mamífero que contenga el ADNc de la tiorina de *A. thaliana Ath Thi2.1* y que permita su expresión como una proteína de fusión.

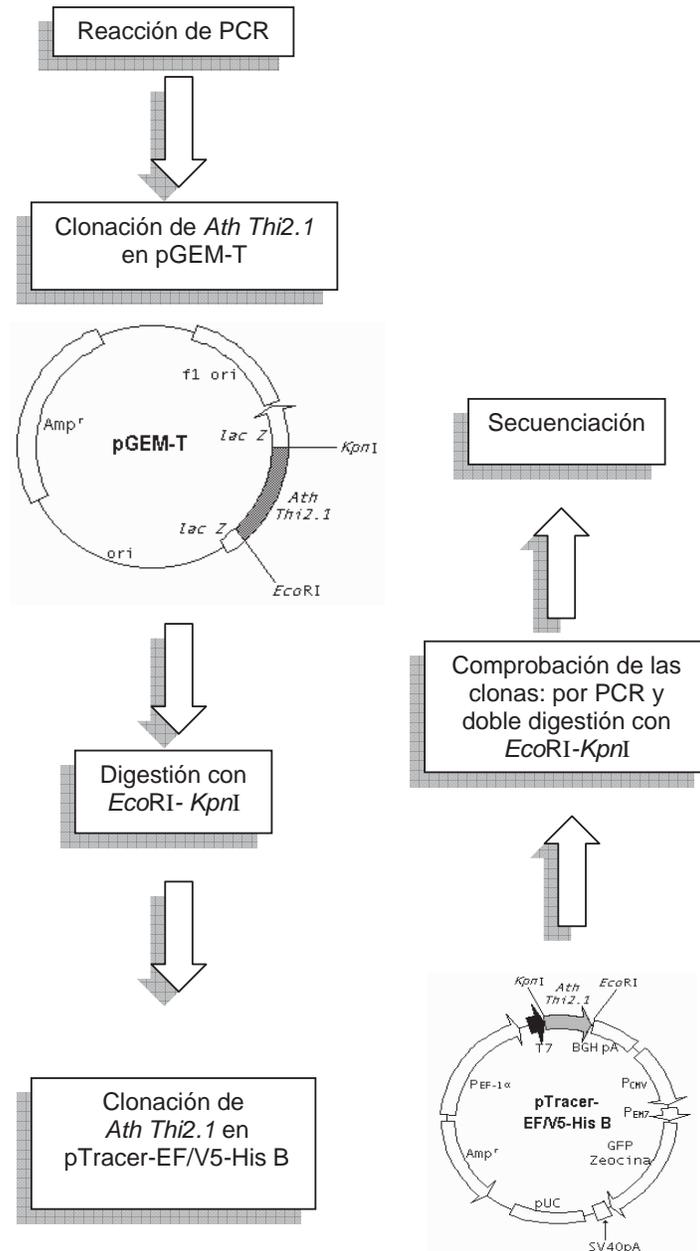
2. Específicos

1. Realizar la clonación genética del ADNc *Ath Thi2.1* de *A. thaliana* en un vector de clonación.
2. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar el ADNc *Ath Thi2.1* del vector de clonación.
3. Realizar la clonación genética del ADNc *Ath Thi2.1* amplificado en el vector de expresión para células de mamíferos pTracer-EF/V5-His B.
4. Verificar la clonación de *Ath Thi2.1* en pTracer-EF/V5-His B mediante el análisis de la secuencia.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estrategia experimental





2. ADNc *Ath Thi2.1*

El ADNc *Ath Thi2.1* proveniente de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Columbia*, está clonado en el sitio *EcoRI* del vector pUC19 (Vignutelli *et al.*, 1998) y fue donado por el Dr. Klaus Apel (Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland).

El ADNc *Ath Thi2.1* cuenta con 402 pares de bases (pb). Este codifica para una péptido antimicrobiano de 134 aa, dividido en tres porciones (péptido señal, péptido maduro y el C-terminal), este péptido presenta 6 residuos de cisteína y un residuo de tirosina en la posición 13 del péptido maduro. La Figura 10 muestra la organización de las porciones presentes en el péptido (Epple *et al.*, 1995).



Figura 10. Porciones del péptido antimicrobiano *Ath Thi2.1*. El péptido antimicrobiano *Ath Thi2.1* presenta tres porciones. El péptido señal, indicada en negro; péptido maduro (*Ath Thi2.1*), indicado en gris y el C-terminal, señalado en blanco.

3. Características del vector pTracer-EF/V5-His (Invitrogen)

pTracer-EF/V5-His (Figura 11) es un vector de expresión para células de mamíferos, diseñado para ser detectado en células transformadas de *E. coli* y en células transfectadas de mamífero. Este vector produce altos niveles de la proteína de interés, y puede ser usado tanto en expresiones estables como en expresiones transitorias.

El vector pTracer-EF/V5-His (5927 pb), esta disponible en tres versiones (A, B y C), que permiten que el ADNc a clonar quede en fase y sea expresado como una proteína de fusión en la línea celular que contenga dicha construcción. En adición a estas características, el vector presenta el sitio del oligonucleótido T7 (permite secuenciar el inserto), el gen de resistencia a zeocina (permite la selección de *E. coli* transformadas), al igual que el gen de resistencia a ampicilina, además el vector cuenta con el origen de replicación pUC que permite la replicación, mantenimiento y un alto número de copias en *E. coli*.

6. Purificación de los fragmentos de ADN por “Gene Clean”

Una vez que los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (0.8 %), se cortó la banda de interés correspondiente al tamaño esperado y se depositó en un tubo Eppendorf. Se le adicionaron 3 volúmenes de yoduro de sodio o yoduro de potasio (6 M) y se fundió a 55°C por 5 min. Se adicionaron 25 µl de “Glass milk”. La mezcla fue agitada ocasionalmente e incubada por 5 min a 4°C. Se centrifugó con un pulso de 13,000 rpm para precipitar el complejo vidrio-ADN. La pastilla se resuspendió en tres ocasiones con 500 µl de “New wash” (0.2 M cloruro de sodio, 0.02 M Tris-HCl, 0.002 M EDTA, etanol 50%), se colectó por centrifugación a 13,000 rpm y se secó en el concentrador a 60°C. Se resuspendió en 10 µl de agua desionizada estéril y se incubó por 5 min a 55°C, para facilitar la solubilidad del ADN en el agua. Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm, durante 30 s, y se recuperó el sobrenadante.

7. Ligación de fragmentos de ADN

Las relaciones del inserto y del vector utilizadas para la ligación de los fragmentos en los vectores se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{(\text{ng del vector})(\text{kb del inserto})}{\text{kb del vector}} \right) \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right)$$

Se utilizaron las relaciones 1/1, 1/3, 3/1, para 100 ng del vector, Una vez que las relaciones inserto-vector fueron calculadas, la mezcla se colocó en un tubo Eppendorf (en hielo): vector (100 ng), la cantidad correspondiente de inserto en ng, 1 µl de amortiguador de ligación (10 X), 1 µl de T4 ADN ligasa (3 U/µl) y agua desionizada estéril c.b.p. 10 µl. Las ligaciones fueron centrifugadas por unos segundos y se incubaron a 16°C toda la noche. Las mezclas de ligación fueron dializadas con agua desionizada estéril por 30 min a través de una membrana de 0.025 µm (Millipore) antes de realizar la electroporación de células de *E. coli*. En el caso de células ultracompetentes de *E. coli* para choque térmico, no fue necesaria la diálisis.

8. Preparación de células de *Escherichia coli* ultracompetentes para choque térmico

Se inocularon 10 ml de medio LB (1 g triptona, 0.5 g extracto de levadura, 0.5 g cloruro de sodio) o SOB (2 g triptona, 0.5 g extracto de levadura, 500 mM cloruro de sodio, 500 mM cloruro de potasio, 100 mM cloruro de magnesio, 100 mM sulfato de magnesio, agua desionizada estéril c.b.p 100 ml, pH 7.0) con la cepa DH5- α de *E. coli* (invitrogen). El cultivo se incubó en agitación durante 6 h a 37°C, y posteriormente se inoculó en 250 ml de medio SOB y se cultivaron toda la noche a 22°C en agitación moderada. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0.55 se transfirió a hielo por 10 min. Se colectaron las células por centrifugación (3,900 rpm, 10 min, 4°C), se lavaron con amortiguador de transformación (55 mM cloruro de magnesio, 15 mM cloruro de calcio, 250 mM cloruro de potasio, 10 mM PIPES, agua desionizada estéril c.b.p 1 L y 1.5 ml de DMSO) a 0°C y se precipitaron por centrifugación. Se dejó secar la pastilla y se resuspendieron las células en 20 ml de amortiguador de transformación. Se hicieron alícuotas de 100 μ l en tubos Eppendorf los cuales se incubaron en hielo durante 10 min, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su uso a -70°C (Sambrook y Russell, 2001).

9. Transformación de células de *Escherichia coli* ultracompetentes por choque térmico

Las células ultracompetentes para choque térmico se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron a 4°C hasta su uso. En un tubo Eppendorf en hielo, se mezclaron 50 μ l de células competentes con 25 ng de ADN (el volumen no excedió el 5 % de las células competentes), la mezcla se conservó en hielo por 30 min. Posteriormente el tubo fue transferido a 37°C por 3 min y luego a hielo por 3 min. Finalizado el choque térmico se adicionaron 250 μ l de LB o SOB a la mezcla y se incubó por 30 min a 37°C en agitación. Finalmente, se inocularon de 50 a 200 μ l en cajas que contenían LBA con el o los antibióticos de selección. Estas cajas fueron incubadas por 16 h a 37°C. Las colonias transformantes fueron

analizadas mediante minipreparación de ADN plasmídico (Sambrook y Russell, 2001).

10. Preparación de células de *Escherichia coli* para electroporación

Se inocularon 2 ml de medio LB con la cepa *E. coli* XL 1-Blue (Stratagen) o Top 10 (Invitrogen), y se incubaron toda la noche a 37°C. Este cultivo se utilizó para inocular 250 ml de medio LB, se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 a 1, se colectaron las células por centrifugación a 6,000 rpm, durante 10 min a 4°C, y se lavó la pastilla con 250 ml de agua desionizada estéril a 4°C, se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con 125 ml de agua desionizada estéril a 4°C, se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10 % y se centrifugó. Finalmente, se resuspendió en 1 ml de glicerol frío al 10 %. Las células se distribuyeron en alícuotas de 100 µl y se almacenaron hasta su uso a -70°C.

11. Electroporación de células de *Escherichia coli*

Las células para electroporación de *E. coli* se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en hielo. Se mezclaron 50 µl de las células con 20 ng del ADN del producto de ligación. Se usaron 2.5 kV en el *E. coli* Pulser de Bio-Rad. La mezcla se colocó en la celda de electroporación (0.2 cm) y se le aplicó un pulso de 0.5 ms. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de medio LB y las células se transfirieron a un tubo de 15 ml y se incubaron por 1 h a 37°C. Por último se añadieron de 50 a 200 µl de medio en cajas de LBA con el o los antibióticos de selección. Estas cajas fueron incubadas por 16 h a 37°C.

12. Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación)

Las colonias transformantes fueron usadas para el aislamiento del ADN plasmídico. Se utilizó el método de lisis alcalina con SDS de acuerdo al protocolo de Sambrook y Russell, 2001. Se inocularon 2 ml de medio LB (con el antibiótico de selección adecuado) con una colonia de bacterias transformantes. Este cultivo se incubó 16 h a 37°C con una agitación de 120 rpm, se tomó una alícuota de 1.5 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm. Se descartó

el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 100 μ l de la solución I (0.1 M glucosa, 0.01 M EDTA, 0.05 M Tris, pH 8). Se le adicionó 200 μ l de la solución II (0.2 M hidróxido de sodio, 1 % SDS) y se mezcló por inversión. Se agregaron 150 μ l de la solución III (acetato de sodio 3 M, pH 4.8), agitándolo levemente y se incubó por 10 min en hielo. A continuación, el tubo fue centrifugado a 12,000 rpm por 5 min a 4°C y se colectó el sobrenadante en un tubo Eppendorf. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol frío, incubándose por 5 min a temperatura ambiente y el ADN se colectó por centrifugación. Finalmente, la pastilla de ADN se resuspendió en 30 μ l de agua desionizada estéril. Las muestras se analizaron en geles de agarosa.

13. Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol

El ADN obtenido se llevó a un volumen de 200 μ l con agua desionizada estéril en un tubo Eppendorf y se le adicionaron 140 μ l de acetato de amonio 7.5 M, se le agregaron 5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcló por inversión. Posteriormente, se adicionaron 350 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezclaron por inversión hasta formar una emulsión. La emulsión fue centrifugada a 13,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 600 μ l de etanol absoluto frío o 300 μ l de isopropanol frío. Se mezcló suavemente por inversión para precipitar los ácidos nucleicos y se incubó 5 min en hielo. La solución se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para empastillar los ácidos nucleicos, la pastilla se lavó con 200 μ l de etanol al 70 % frío y se secó en el concentrador a 60°C. Finalmente, se resuspendió en un volumen adecuado de agua desionizada estéril o amortiguador TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) dependiendo de la concentración del ADN obtenido.

14. Limpieza de ADN con fenol-cloroformo

El ADN se llevó a un volumen de 500 μ l con agua desionizada estéril en un tubo Eppendorf, se le agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló hasta formar una sola fase y se centrifugó 5 min a 14,000

rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se le agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó 5 min a 14,000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó un volumen de isopropanol frío y 1/10 de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. La mezcla se incubó a -20°C durante 10 min y se centrifugó 10 min a 14,000 rpm. Posteriormente, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min a 14,000 rpm. La pastilla se lavó nuevamente con 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó 10 min. a 14,000 rpm. Finalmente, se resuspendió en un volumen adecuado de agua desionizada estéril o amortiguador TE, dependiendo de la concentración del ADN obtenido.

15. Secuenciación de ADN

La secuenciación, para corroborar las inserciones del ADNc *Ath Thi2.1* en el vector de expresión (pTracer-EF/V5-His) y en el vector de clonación (pGEM-T), se realizó de manera automática en un secuenciador ABI PRISM 310. Con el kit Big Dye Terminator v3.1 de Applied Biosystem y el oligonucleótido T7. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador con las siguientes condiciones: 25 ciclos 96°C, 30 s (desnaturalización); 50°C, 30 s (alineamiento) y 60°C, 4 min (extensión). Al producto de amplificación se le adicionó 2 µl de EDTA (125 mM), 2 µl de acetato de sodio (3 M, pH 4.8) y 50 µl de etanol absoluto, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La muestra se centrifugó 20 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 250 µl de etanol al 70 % y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm. Se secó la pastilla y se resuspendió en 25 µl de amortiguador TSR o formamida, agitando de 2 a 3 min. Se incubó por 2 min a 95°C y se pasó al hielo por 5 min. La muestra se transfirió a un tubo de secuenciación el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis. La secuencia se determinó utilizando el Software Sequencing Analyzes 3.0 (Applied Biosystems), mientras que la comparación y análisis de las secuencias se realizó con el Software DNASTAR 4.0.

16. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el ADNc *Ath Thi2.1* proveniente de *A. thaliana*

Con base en la secuencia obtenida de la clona de *E. coli* (DH5- α) que contenía la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*, se diseñó un par de oligonucleótidos para el ADNc *Ath Thi2.1*, con la ayuda del Software OLIGO 4.1.

Con el propósito de dirigir la clonación, permitir que el ADNc quedara en fase en el vector pTracer-EF/V5-His B y que *Ath Thi2.1* se expresara como una proteína de fusión en líneas celulares de mamífero, se diseñaron los oligonucleótidos con un sitio de corte *EcoRI* al 3' que reconoce la secuencia GAATTC y con un sitio de corte *KpnI* al 5' que reconoce la secuencia GGTACC (Tabla 3).

El producto de amplificación (~400 pb) se clonó en el vector comercial pGEM-T (Promega) y posteriormente se subclonó en los sitios *KpnI* y *EcoRI* del vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His B.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados		
NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
5' KPNTIONINA	TTA GGT ACC <u>GTT</u> ATG AAA GGA AGA ATT	Sitio de corte <i>KpnI</i> (GGTACC) Sitio Kozak (GTT)
3' ECOPTCTIO	TT AGA ATT <u>CGA</u> CAA CAG TTT AGG CGG	Sitio de corte <i>EcoRI</i> (GAATTC) Bases implicadas en la sustitución del codón de terminación (CG)

17. Reacción de PCR

Las reacciones de PCR se prepararon en un tubo para PCR, donde se colocaron: 25 ng de ADN, 0.6 μ l de cloruro de magnesio (50 mM), 2 μ l de amortiguador de magnesio (10 X), 0.4 μ l de dNTP's (10 mM), 1 μ l de cada oligonucleótido (10 pmol/ μ l), 0.5 μ l de *Taq* polimerasa (5 U/ μ l) y por último se le agregó agua desionizada estéril c.b.p 20 μ l. Las reacciones de amplificación se

realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las condiciones descritas en la Tabla 4. Una vez terminada la reacción de PCR las muestras fueron verificadas en un gel de agarosa al 0.8% para observar la amplificación.

Tabla 4. Condiciones de las reacciones de PCR			
PROCESO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalización	94	5:00	1
Desnaturalización	94	0:30	30
Alineamiento	58	1:00	
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	1

VII. RESULTADOS

1. Obtención del inserto *Ath Thi2.1* de pUC19 con la enzima *EcoRI*

La construcción pUC19–*Ath Thi2.1*, (~3,313 pb) (Vignutelli *et al.*, 1998), se digirió con la enzima *EcoRI* y se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa. La Figura 12 muestra el patrón electroforético de la digestión de pUC19–*Ath Thi2.1* con *EcoRI*. Como se puede apreciar en el segundo carril, se localiza una banda de ~2,686 pb, correspondiente al vector y una banda de ~600 pb correspondiente al inserto *Ath Thi2.1*.

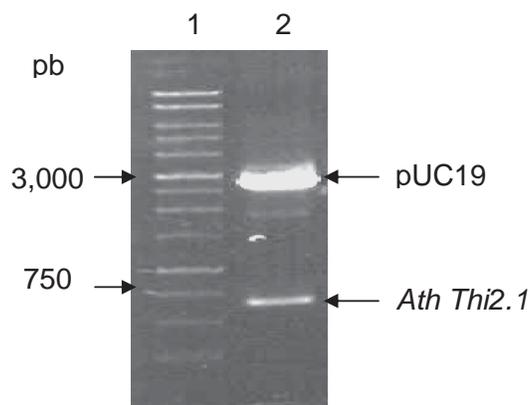


Figura 12. Digestión de la construcción pUC19–*Ath Thi2.1* con la enzima *EcoRI*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 1) Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); 2) digestión de la construcción pUC19–*Ath Thi2.1* con la enzima *EcoRI*.

2. Clonación del ADNc *Ath Thi2.1* en el sitio *EcoRI* del vector pTracer-EF/V5-His B

Una vez obtenido el inserto del ADNc *Ath Thi2.1* de (~600 pb), el vector pTracer-EF/V5-His B fue digerido con la enzima *EcoRI* y se purificó mediante Gene Clean (~6,000 pb). Una vez purificado el inserto y el vector se calcularon las relaciones inserto/vector y se realizó la ligación.

La ligación pTracer-EF/V5-His B–*Ath Thi2.1* (*EcoRI*), se empleó para transformar células DH5 α de *E. coli*. Se obtuvieron las transformantes y se analizaron por minipreparación. El ADN plasmídico de las clonas transformadas se digirió con *EcoRI*, con el fin de corroborar si el ADNc *Ath Thi2.1* estaba integrado en el vector. La Figura 13 muestra la digestión del ADN plasmídico obtenido a

partir de una colonia transformada con la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*), que liberó el fragmento de ~600 pb, el cual corresponde al ADNc de *Ath Thi2.1*.

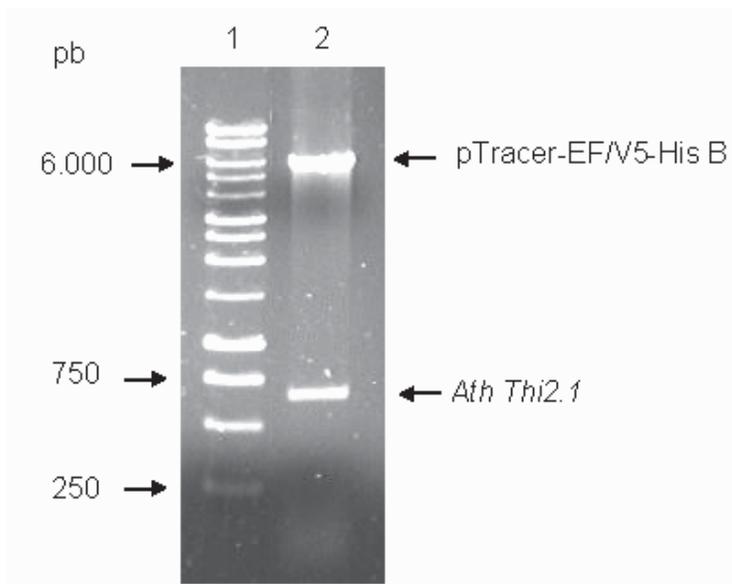


Figura 13. Digestión de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*), con la enzima *EcoRI*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 1) Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); 2) digestión con la enzima *EcoRI* del ADN plasmídico de una colonia de células transformadas con la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*).

Para confirmar la clonación del fragmento de *Ath Thi2.1* (~600 pb) en el vector pTracer-EF/V5-His B se determinó la secuencia y orientación de la misma, utilizando el oligonucleótido T7 el cual va dirigido contra el vector. El análisis permitió identificar que el inserto se había clonado de manera invertida, por lo que no se expresaría. A partir de este momento, se determinó utilizar esta construcción como un control negativo en los eventos de transformación futuros. Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos con sitios de corte para las enzimas *KpnI* y *EcoRI* con el fin de dirigir la ligación del inserto en el vector pTracer-EF/V5-His B. La Figura 14 muestra parte de la secuencia de nucleótidos determinada para la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*).

↓ Vector pTCB ↓ EcoRI

CCA GTG TGG TGG **AAT TCC** CGG GCA GGT CCC GGG CAG GTT TTT TTT TTT TTT AAA AGA 57

Pro Val Trp Trp Asn Ser Arg Ala Gly Pro Gly Gln Val Phe Phe Phe Phe Lys Arg 19

CAC GTA CGT TTA ACT CTT TAT TTA GGT TAT AGG AAG TAG AGG GCA TGT ACA ATC TAG 104

His Val Arg Leu Thr Leu Tyr Leu Gly Tyr Arg Lys * Arg Ala Cys Thr Ile * 38

TGA TCG AAC AAA CCT TCT ACG ACA CAT GCA CAC ACA CAC ACA CAA ACC AGA ATA GCA 171

* Ser Asn Lys Pro Ser Thr Thr His Ala His Thr His Thr Gln Thr Arg Ile Ala 57

AGA GTC TAG CAT TTG TTT TTT CAC ATA TAC GAC **CAT TAC** AAC AGT TTA GGC GGC CCA 228

Arg Val * His Leu Phe Phe His Ile Tyr Asp His Tyr Asn Ser Leu Gly Gly Pro 76

GGT GGG ACT ACA TAG CTC TTG GTA CAG AAA ATA GAA CAT CCC TTG GCA CAT TGT TCC 285

Gly Gly Thr Thr * Leu Leu Val Gln Lys Ile Glu His Pro Leu Ala His Cys Ser 95

GAC GCT CCA TTC ACA ATT TCA CTT GCA TCA GAG TTC TGG AGA GTG TTC ATG GCA CCA 342

Asp Ala Pro Phe Thr Ile Ser Leu Ala Ser Glu Phe Trp Arg Val Phe Met Ala Pro 114

CAC ACA GAA GTT TCA CAC CCT AAC TTG CAG TGC TCA TTG GTA GCA TCA GCT GAG TTT 399

His Thr Glu Val Ser His Pro Asn Leu Gln Cys Ser Leu Val Ala Ser Ala Glu Phe 133

TCG AGA ATG GCG TTT ACC CAA CCT CGA GGG CAT GTA TCA GAG TTT TGG CAT CCA CTC 456

Ser Arg Met Ala Phe Thr Gln Pro Arg Gly His Val Ser Glu Phe Trp His Pro Leu 152

ACT TGC ATA CAC CTT CCC TTG GAA AAC CTT ATA CGG CAT ACA CTA TAG CCA TTT CTA 513

Thr Cys Ile His Leu Pro Leu Glu Asn Leu Ile Arg His Thr Leu * Pro Phe Leu 171

GCT TGG TTG GAA GGG CAG CAG ATC TTT GCT TCT ACT TGA ACT TGT GCC ATG ACC AGA 570

Ala Trp Leu Glu Gly Gln Gln Ile Phe Ala Ser Thr * Thr Cys Ala Met Thr Arg 190

CTC ATT ATG AGC AAA CTC AAA ATC AAA ATT CTT CCT **TTC AT** 611

Leu Ile Met Ser Lys Leu Lys Ile Lys Ile Leu Pro Phe Ile 204

Figura 14. Secuencia de nucleótidos del ADNc *Ath Thi2.1* en la construcción pTracer-EFV5-His B-*Ath Thi2.1* (EcoRI). Se muestra la secuencia de aa deducida a partir de los nucleótidos. CAT (reverso complementario de ATG): Codón de inicio; TTA (reverso complementario de TAA): Codón de terminación; *: Otros codones de terminación; GAATTC: Sitio de corte *EcoRI*.

3. Amplificación del ADNc *Ath Thi2.1* con los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO

Una vez obtenida la secuencia del ADNc de *Ath Thi2.1* se emplearon los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3, los cuales poseen los sitios de corte *KpnI* y *EcoRI* para amplificar el ADNc *Ath Thi2.1* a partir de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*) y permitir que dicha amplificación quedara en fase en la versión B del vector pTracer-EF/V5-His B. La Figura 15 muestra el producto de amplificación (~400 pb) del ADNc *Ath Thi2.1* utilizando como ADN molde el fragmento de 600 pb obtenido por digestión con *EcoRI* de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (*EcoRI*).

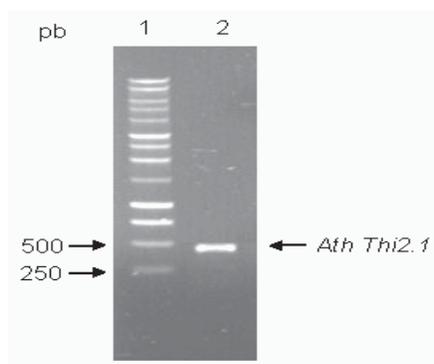


Figura 15. Producto de amplificación del ADNc *Ath Thi2.1* con los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 1) Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); 2) producto de amplificación *Ath Thi2.1* (~400 pb) por PCR.

4. Clonación del producto de amplificación en el vector pGEM-T

El producto de amplificación del ADNc *Ath Thi2.1* que se obtuvo por PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega). Las colonias transformadas con la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1* que presentaron un color blanco se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico y amplificar mediante PCR con los oligonucleótidos KPNTIONINA-ECOPTCTIO. Las colonias que amplificaron un producto de ~400 pb fueron digeridas con *KpnI* y *EcoRI*. La Figura 16 A muestra la presencia del *Ath Thi2.1* en la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1* por PCR en diferentes colonias transformadas. De éstas, se seleccionó la que amplificó la mayor cantidad de producto de PCR de ~400 pb (colonia C1), la cual se sometió a

una doble digestión con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*, mostrando también un producto del mismo tamaño (Figura 16 B).

El ADN plasmídico de la colonia C1 se secuenció con el oligonucleótido T7. La Figura 17 muestra la secuencia obtenida de esta colonia correspondiente a la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1*

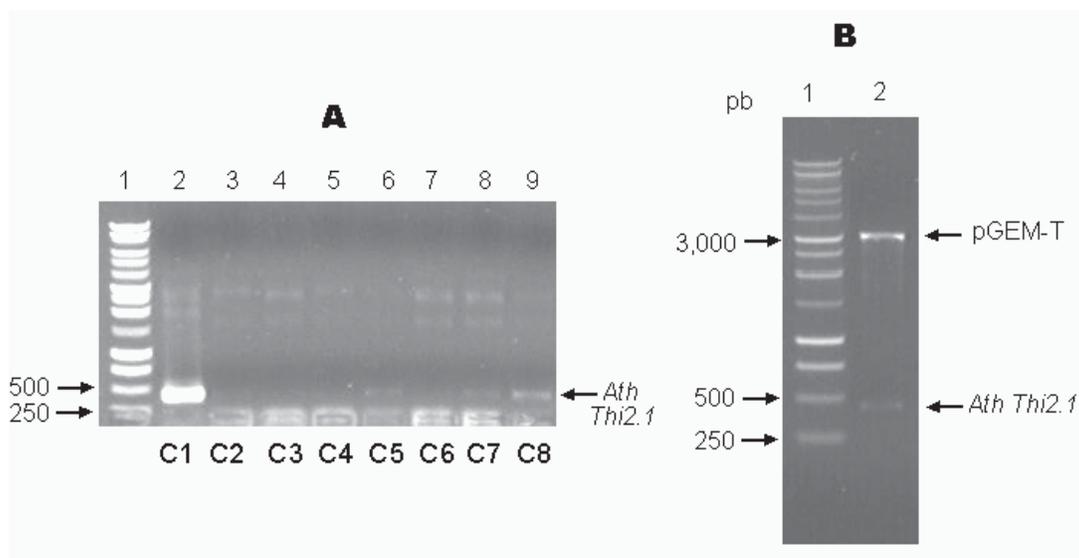


Figura 16. Confirmación de la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1*. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 1) Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carriles 2-9 PCR del ADN plasmídico de las colonias 1 a 8 (C1-C8) que contienen la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1*. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 1) Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); 2) doble digestión (*KpnI*-*EcoRI*) del ADN de la colonia C1 (positiva).

```

↓ Kpn I      ↓ Codón de inicio
GGT ACC GTT ATG AAA GGA AGA ATT TTG ATT TTG AGT TTG CTC ATA ATG AGT CTG GTC 57
Gly Thr Val Met Lys Gly Arg Ile Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ile Met Ser Leu Val 19
ATG GCA CAA GTT CAA GTA GAA GCA AAG ATC TGC TGC CCT TCC AAC CAA GCT AGA AAT 114
Met Ala Gln Val Gln Val Glu Ala Lys Ile Cys Cys Pro Ser Asn Gln Ala Arg Asn 38
GGC TAT AGT GTA TGC CGT ATA AGG TTT TCC AAG GGA AGG TGT ATG CAA GTG AGT GGA 171
Gly Tyr Ser Val Cys Arg Ile Arg Phe Ser Lys Gly Arg Cys Met Gln Val Ser Gly 57
TGC CAA AAC TCT GAT ACA TGC CCT CGA GGT TGG GTA AAC GCC ATT CTC GAA AAC TCA 228
Cys Gln Asn Ser Asp Thr Cys Pro Arg Gly Trp Val Asn Ala Ile Leu Glu Asn Ser 76
GCT GAT GCT ACC AAT GAG CAC TGC AAG TTA GGG TGT GAA ACT TCT GTG TGT GGT GCC 285
Ala Asp Ala Thr Asn Glu His Cys Lys Leu Gly Cys Glu Thr Ser Val Cys Gly Ala 95
ATG AAC ACT CTC CAG AAC TCT GAT GCA AGT GAA ATT GTG AAT GGA GCG TCG GAA CAA 342
Met Asn Thr Leu Gln Asn Ser Asp Ala Ser Glu Ile Val Asn Gly Ala Ser Glu Gln 114
TGT GCC AAG GGA TGT TCT ATT TTC TGT ACC AAG AGC TAT GTA GTC CCA CCT GGG CCG 399
Cys Ala Lys Gly Cys Ser Ile Phe Cys Thr Lys Ser Tyr Val Val Pro Pro Gly Pro 133
CCT AAA CTG TTG TCG AAT TCT 420
                               ↑ EcoRI
Pro Lys Leu Leu Ser Asn Ser 140

```

Figura 17. Secuencia de nucleótidos del ADNc *Ath Thi2.1* presente en la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1*. Se muestra la secuencia de aa deducida a partir de los nucleótidos. ATG: Codón de inicio; GAATTC: Sitio de corte *EcoRI*; GGTACC: Sitio de corte *KpnI*.

5. Subclonación del ADNc *Ath Thi2.1* en los sitios *KpnI-EcoRI* del vector pTracer-EF/V5-His B

Una vez analizada la secuencia de la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1* y, comprobado que el ADNc *Ath Thi2.1* contaba con los sitios *KpnI* y *EcoRI*, que le permitirían insertarse en fase en el vector de expresión de células de mamífero pTracer-EF/V5-His B, se digirió este vector con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*.

El ADNc *Ath Thi2.1* con los sitios de corte *KpnI-EcoRI*, se obtuvo tras la doble digestión de la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1* con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*. Esta digestión se sometió a electroforesis, se purificó y se ligó en el vector pTracer-EF/V5-His B, ya digerido. Las colonias transformantes se obtuvieron tras la selección con ampicilina y zeocina durante 3 días. Se analizó el ADN plasmídico de todas las colonias transformantes. Para ello se mezcló la extracción de ADN

plasmídico de tres colonias en cada reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos KPNTIONINA–ECOPTCTIO, posteriormente se realizó la doble digestión del ADN plasmídico de las agrupaciones positivas con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*. La Figura 18 muestra la presencia de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*, determinada con ambas aproximaciones, mostrando un producto de ~400 pb. Las mezclas que produjeron una amplificación mas intensa por PCR (Figura 18 A), fueron digeridas con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* (Figura 18 B). Una vez identificadas las agrupaciones que contenían la construcción, se digirió de manera independiente el ADN de cada colonia, con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* (Figura 18 C).

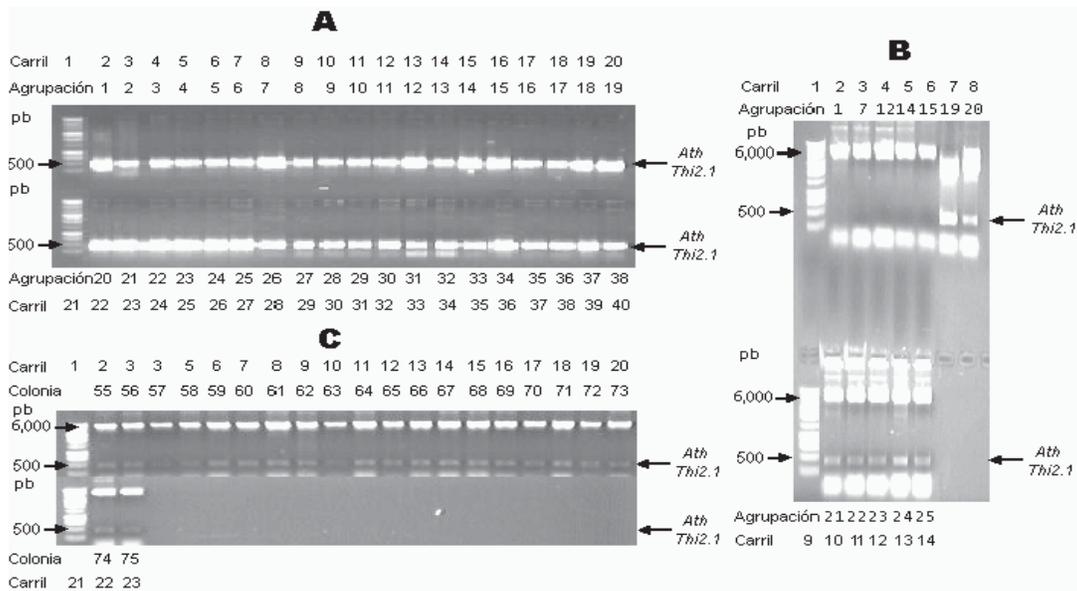


Figura 18. Corroboración de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*, por PCR y doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*). **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Carriles 1 y 21: Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carriles del 2 al 20 y del 22 al 40: PCR utilizando ADN plasmídico de las agrupaciones 1 a la 38. **B)** Carriles 1 y 9: Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carriles del 2 al 8 y del 10 al 14: doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*) del ADN plasmídico de las agrupaciones 1, 7, 12, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 (las agrupaciones positivas a la presencia de la construcción se encuentran subrayadas). **C)** Carriles 1 y 21: Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carriles del 2 al 20 y del 22 al 23: doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*) del ADN plasmídico de las colonias 55-75 (todas son positivas).

A partir de las colonias que dieron positivo por PCR y doble digestión, se tomaron 2 al azar para ser secuenciadas (61 y 68). La Figura 19 muestra la doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*) y la PCR de estas clonas con los oligonucleótidos KPNTIONINA–ECOPTCTIO.

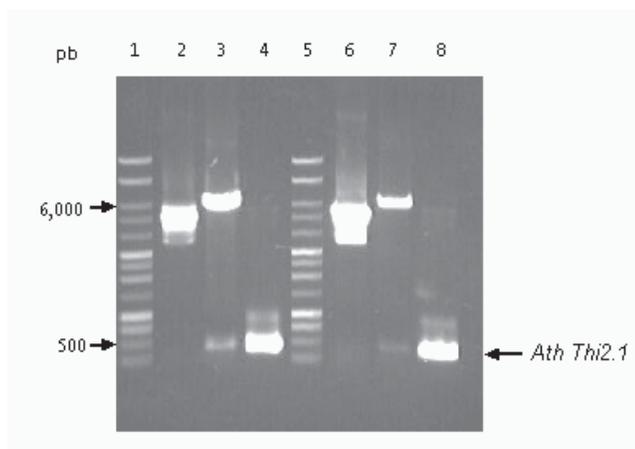


Figura 19. Presencia de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* en las colonias 61 y 68. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carril 2: integridad del ADN plasmídico de la clona 61 (construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*); Carril 3: doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*) del ADN plasmídico de la clona 61; Carril 4: PCR del ADN plasmídico de la clona 61; Carril 5: Marcador de tamaño molecular (1 kb DNA Ladder, Invitrogen); Carril 6: integridad del ADN plasmídico de la clona 68 (construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*); Carril 7: doble digestión (*KpnI*–*EcoRI*) del ADN plasmídico de la clona 68; Carril 8: PCR del ADN plasmídico de la clona 68.

Una vez demostrada la presencia de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* (Figura 18) en estas dos colonias, se analizó la secuencia para corroborar que el ADNc *Ath Thi2.1* se encontraba en fase en el vector. La Figura 20 muestra la secuencia de la clona 61, y se demuestra que está en fase, que corresponde al ADNc de *Ath Thi2.1* y que podrá ser expresado como una proteína de fusión con el epítipo V5 y una cola de histidinas en el carboxilo terminal, lo que permitirá su posterior detección y purificación (Figura 21). El tamaño aproximado del péptido es de 12.6 kDa.

```

↓Vector pTCB           ↓ Codón de inicio
AAG CTT GGT ACC GTT ATG AAA GGA AGA ATT TTG ATT TTG AGT TTG CTC ATA ATG AGT 57
      ↑ Kpn I
      Met Lys Gly Arg Ile Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ile Met Ser 19

CTG GTC ATG GCA CAA GTT CAA GTA GAA GCA AAG ATC TGC TGC CCT TCC AAC CAA GCT 114
Leu Val Met Ala Gln Val Gln Val Glu Ala Lys Ile Cys Cys Pro Ser Asn Gln Ala 38

AGA AAT GGC TAT AGT GTA TGC CGT ATA AGG TTT TCC AAG GGA AGG TGT ATG CAA GTG 171
Arg Asn Gly Tyr Ser Val Cys Arg Ile Arg Phe Ser Lys Gly Arg Cys Met Gln Val 57

AGT GGA TGC CAA AAC TCT GAT ACA TGC CCT CGA GGT TGG GTA AAC GCC ATT CTC GAA 228
Ser Gly Cys Gln Asn Ser Asp Thr Cys Pro Arg Gly Trp Val Asn Ala Ile Leu Glu 76

AAC TCA GCT GAT GCT ACC AAT GAG CAC TGC AAG TTA GGG TGT GAA ACT TCT GTG TGT 285
Asn Ser Ala Asp Ala Thr Asn Glu His Cys Lys Leu Gly Cys Glu Thr Ser Val Cys 95

GGT GCC ATG AAC ACT CTC CAG AAC TCT GAT GCA AGT GAA ATT GTG AAT GGA GCG TCG 342
Gly Ala Met Asn Thr Leu Gln Asn Ser Asp Ala Ser Glu Ile Val Asn Gly Ala Ser 114

GAA CAA TGT GCC AAG GGA TGT TCT ATT TTC TGT ACC AAG AGC TAT GTA GTC CCA CCT 399
Glu Gln Cys Ala Lys Gly Cys Ser Ile Phe Cys Thr Lys Ser Tyr Val Val Pro Pro 133

GGG CCG CCT AAA CTG TTG TCG AAT TCT GCA GAT 432
      ↑ EcoR I   ↑ Vector pTCB
Gly Pro Pro Lys Leu Leu Ser Asn Ser Ala Asp 144

```

Figura 20. Secuencia de nucleótidos del ADNc *Ath Thi2.1* presente en la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*. Se muestra la secuencia de aa deducida a partir de los nucleótidos. ATG: Codón de inicio; GAATTC: Sitio de corte *EcoRI*; GGTACC: Sitio de corte *KpnI*.

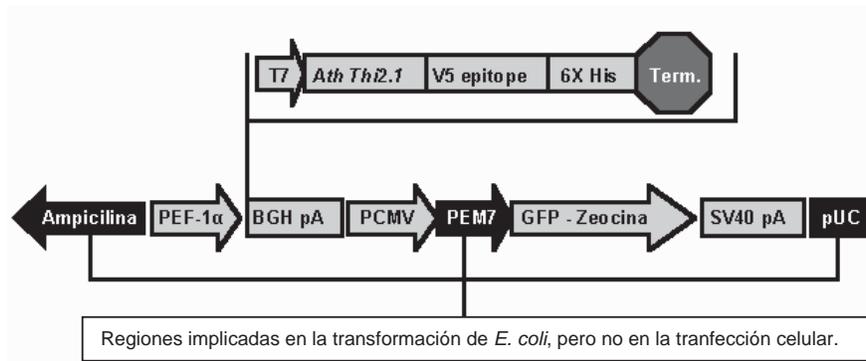


Figura 21. Construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*. En esta figura se representan las características de la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1*, que permitirá expresar una proteína de fusión (Thi2.1-Epitope V5- Cola de histidinas).

VIII. DISCUSIÓN

En la actualidad la actividad antifúngica de los péptidos antimicrobianos ha sido escasamente documentada. Hasta la fecha no existen reportes sobre la expresión de tioninas de plantas en células animales. Es por esto que la originalidad de este trabajo radica en la posibilidad de expresar una tionina de plantas en células de mamífero que confiera resistencia contra patógenos animales. En el presente trabajo se clonó el ADNc del péptido antimicrobiano Ath Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* en el vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His B.

Al inicio de este trabajo se intentó clonar directamente el ADNc *Ath Thi2.1*, delimitado por dos sitios *EcoRI* en el vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5-His en las versiones A, B y C, pero debido a la baja tasa de colonias transformantes se decidió analizar la secuencia de dichas construcciones. El resultado obtenido mostró que el ADNc *Ath Thi2.1* se encontraba invertido en las tres versiones del vector (Figura 14). Sin embargo, se realizaron posteriores clonaciones del ADNc *Ath Thi2.1* en las tres versiones del vector para descartar problemas técnicos, encontrándose siempre el inserto invertido. A pesar de esto, las construcciones pTracer-EF/V5-His A, B y C, con el ADNc *Ath Thi2.1*, delimitado por los dos sitios *EcoRI*, pueden ser utilizadas como controles negativos de transformación celular, debido a que estas construcciones presentan el inserto en una posición invertida (Figura 14) por lo que no es posible expresar *Ath Thi2.1* en las células transfectadas, y además contienen y expresan el resto de las características del vector como los genes de resistencia.

La baja tasa de colonias transformantes, así como la presencia del inserto invertido en las tres versiones del vector pTracer-EF/V5-His, pudo deberse a que las colonias de *E.coli* que presentaban el ADNc *Ath Thi2.1* en fase en alguna de las versiones del vector pTracer-EF/V5-His, presentaban una producción mínima del péptido antimicrobiano, el cual probablemente fue tóxico para las células hospederas por efecto de su interacción sobre *E. coli*. La expresión del péptido por las bacterias pudo ser el resultado de la unión de la ARN-Polimerasa de *E.coli* a la caja de Pribnow (TATAAT) presente en el promotor P_{EF-1α} de pTracer-EF/V5-His,

provocando con esto que se tradujera el péptido antimicrobiano Ath Thi2.1 (Siebenlist *et al.*, 1980). Esto podría explicar que solo sobrevivieran aquellas bacterias transformadas con el vector que contenía el inserto invertido.

A partir de estos resultados, se diseñaron un par de oligonucleótidos (5' KPNTIONINA y 3' ECOPTCTIO) para amplificar específicamente el ADNc *Ath Thi2.1* y dirigir su clonación. Por una parte el oligonucleótido KPNTIONINA acopló un sitio *KpnI* al extremo 5' y una secuencia de iniciación de traducción localizada en la posición -3 (sitio Kozak), mientras tanto, el oligonucleótido ECOPTCTIO acopló un sitio *EcoRI* al extremo 3' y adaptó dos bases (CG) para la sustitución del codón de termino (Figura 20). La inserción de estos sitios de restricción permitió realizar una ligación dirigida del ADNc *Ath Thi2.1* en el vector pTracer-EF/V5-His B, para que la expresión de *Ath Thi2.1* fuera dirigida por el promotor P_{EF-1 α} , y se produjera como una proteína de fusión compuesta por la tionina 2.1, el epítopo V5, que permitirá la detección de la proteína por el anticuerpo anti-V5 y una cola de histidinas en el carboxilo terminal, que permitirá la detección de la proteína por el anticuerpo anti-histidina, así como su purificación (Figura 21).

Para corroborar la presencia del ADNc *Ath Thi2.1* tanto en la construcción pGEM-T-*Ath Thi2.1*, como en la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* en fase, se realizó un PCR con los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO. Los resultados mostrados en las Figura 16 A y 18 A, muestran un producto de amplificación de ~400 pb. Posteriormente estas muestras fueron digeridas con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* para confirmar la liberación del ADNc *Ath Thi2.1* de las construcciones. Sin embargo, los resultados mostrados en las Figuras 16 B y 18 B, demuestran que los oligonucleótidos KPNTIONINA y ECOPTCTIO no solo amplifican específicamente el ADNc *Ath Thi2.1*, sino que también otras regiones presentes en el vector pGEM-T así como del vector pTracer-EF/V5-His B. Es por ello, que se tomó como criterio de selección de colonias positivas la intensidad que presentaban las muestras en el gel de agarosa (Figura 16 B y 18 B).

El análisis de la secuencia de una de las clonas transformadas (Figura 20), indica que el ADNc *Ath Thi2.1* se encuentra en fase en el vector de expresión celular pTracer-EF/V5-His B.

Este hecho permitirá que las células de mamífero transfectadas con dicha construcción sean capaces de expresar el péptido antimicrobiano Ath Thi2.1 de *A. thaliana*, confiriéndole a dichas células la propiedad de presentar una actividad antimicrobiana en contra de patógenos de mamíferos.

La construcción pTracer-EF/V5-His B-Ath Thi2.1 (Figura 21), permitirá producir el péptido antimicrobiano Ath Thi2.1 de *A. thaliana*, como una proteína de fusión en las células de mamífero con las siguientes características:

1. Se producirá una proteína de fusión que podrá ser detectada con los anticuerpos anti-V5 y/o anti-Histidinas.
2. Se podrá purificar la proteína de fusión producida por las células utilizando cromatografía de afinidad.

Actualmente, no existe ningún reporte relacionado con la expresión de tioninas en células de mamíferos. Reportes de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la expresión de una defensina de plantas en células endoteliales bovinas (Anaya-López *et al.*, 2006) empleando el mismo vector utilizado en este estudio (pTracer-EF/V5-His C), presenta efectos antimicóticos en contra del hongo patógeno *Candida albicans* y citotóxicos contra líneas tumorales. Sin embargo, la construcción empleada en este trabajo no permite la expresión de la defensina como una proteína de fusión, hecho que dificulta su purificación y detección. Con base en lo anterior, y en los resultados que se desprenden de este trabajo, será posible expresar, producir, detectar y purificar Ath Thi2.1 de *A. thaliana* en células de mamífero, así como valorar sus propiedades antimicrobianas y citotóxicas.

IX. CONCLUSIÓN

Se obtuvo la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* inversa que reúne las características necesarias para usarse como un control negativo de transfección celular, y la construcción pTracer-EF/V5-His B-*Ath Thi2.1* en fase que permitirá expresar el péptido *Ath Thi2.1* como una proteína de fusión en células de mamífero.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. 4ª ed. España. Mc Graw Hill. 282 p.
- Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., Baizabal-Aguirre, V. M. y Ochoa-Zarzosa, A. 2005. Interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares. *Ciencia nicolaita*. 41: 83-96.
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Cano-Camacho, H. y Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotech. Lett.* 28:1101-1108.
- Boulanger, N., Munks, R. J. L., Hamilton, J. V., Vovelle, F., Brum, R, Lehane, M J. y Bulet, P. 2002. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect stomoxys calcitrans. *J Biol Chem.* 227: 49921-49926.
- Broekaert, F. W., Terras, G. F. R., Cammue, A. B. P. y Osborn, W. R. 1995. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol.* 3: 238-250.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P.B., Jr., y Brian F. T. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Ag.* 15: 1-14.
- Castro, F. O. y Portelles, Y. 1997. Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biot Apl.* 14: 147-161.
- Clark, J. R., Daly, L. N. y Craik, J. D. 2005. Structural plasticity of the cyclic cystine knot framework: implications for biological activity and drug design. *Biochem J.* 394: 85-93.
- De Lucca, J. A. y Walsh J. T. 1999. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Ag Chemoth.* 43: 1-11.
- Epple, P. Apel, K. y Bohlmann, H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109: 813-820.

- García, F., Rodríguez, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López, E., Berrocal, M. y Poza, C. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Letters*. 498: 219-222.
- Hegyí, H. y Gerstein, M. 1999. The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *J Mol Biol*. 288: 147-164.
- Hernández, M. A. y Alvarado, A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed*. 12: 272-280.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., Camp, R. O.D, Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A. y Apel, K. 2001. Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J*. 26: 435-446.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., y Shlomchik, M. 2001. Immunobiology. En: The immune system in health and disease. 5ª ed. United States of America. Garland publishing. 12-14 p.
- Kaiser, V. y Diamond Gill. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J Leuk Biol*. 68: 779-784.
- Kaisho, T. y Akira, S. 2001. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scy*. 59: 124-130.
- Lee, G. y Howe, G.A. 2003. The tomato mutant *spr1* is defective in systemic perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J*. 33: 567-576.
- Myard, N., Bulet, P., Caille, A., Daffre, S. y Vovelle, F. 2002. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. *Eur J Biochem FEBS* 269: 1190-1198.
- Montesano, M., Brader, G. y Palva E. T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol plant path*. 4: 73-79.
- Nicholas J. P., Wolf-Dieter R. y Natasha V. R. 2002. Molecular genetics of non-processive glycosyltransferases. *The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists*. 2-9 p.
- Oppenheim, J.J., Biragyn A., Kwak L.W. y Yang, D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*. 62:17-21.
- Ravid, K. y Freshney, R. I. 1998. DNA transfer to cultured cells. United States of America. Wiley- Liss. vii, 56, 59, 60 p.

- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3^a ed. United States of America. CSHL. 112-115.
- Sarmafilk, A. 2002. Antimicrobial peptides: A potential therapeutic alternative for the treatment of fish diseases. *Turk J Biol.* 26: 201-207.
- Segura, A., Moreno, M., Molina, A. y García-Olmeido, F. 1998. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters.* 435: 159-162.
- Siebenlist, U., Simpson, R.B. y Gilbert, W. 1980. *E.coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell.* 20: 269-281.
- Thevissen, A., Ghazi, A., W. De Samblanx, G., Brownlee, C., W. Osborn, R. y F. Broekaert, W. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem.* 271: 15018-15025.
- Vignutelli, A., Wasternack C., Apel K. y Bohlmann H. 1998. Systemic and local induction of an Arabidopsis thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14: 285-295.
- Vizioli, J y Sazet 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci.* 11: 494-496.
- Wick, P. Intracellular vesicle transport in *Arabidopsis thaliana*: functional characterization of the t-SNARE homologue AtSNAP33 (Doctorado). Institut für Pflanzenbiologie, Universität Freiburg (Schweiz). 2002. 171 p.
- Yrä, J., Berninghausen, O. y Leippe, M. 2001. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol.* 189: 169-173 .
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415: 389-395.