

17. Ciencia, Tecnología, e innovación

Diseño de péptidos antifúngicos a partir de dos defensinas de flores de cardo.

Síntesis y actividad contra *Fusarium graminearum*

Fernandez, Agustina¹; Ismael Malbrán^{2,*}; Vairo Cavalli, Sandra Elizabeth^{1,*}

fernandez.agustina@biol.unlp.edu.ar

¹CIProVe-Centro Asociado CIC, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

²CIDEFI-CIC-UNLP, Facultad de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP

*Orientadores

Resumen

Las defensinas vegetales son péptidos básicos ricos en cisteína de 45 a 54 aminoácidos y estructura conservada. A pesar de su similitud estructural presentan diversidad de secuencias, lo cual puede dar cuenta de las diferentes funciones atribuidas (actividad antibacteriana, antifúngica, etc). Se han identificado dos regiones muy conservadas entre las defensinas vegetales, las cuales son importantes en relación con la actividad que exhiben: el γ -core ubicado en la región C-terminal y el α -core localizado en la región N-terminal.

En este trabajo se diseñaron péptidos potencialmente antifúngicos a partir de estas regiones, a través del uso de herramientas bioinformáticas y empleando como plantilla la secuencia de dos defensinas de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. previamente clonadas (DefSm1D y DefSm2). Cinco péptidos fueron sintetizados, purificados y caracterizados: tres derivados de DefSm1D, llamados 3243, 3245 y 3246; y dos a partir de la secuencia de DefSm2, denominados 3248 y 3250. Se evaluó su actividad contra el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe y dos de ellos, 3248 y 3250, resultaron activos en concentraciones micromolares.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de las defensinas, las cuales son proteínas de defensa ricas en cisteína presentes en la especie en estudio, que crece en forma silvestre en Argentina y que naturalmente presenta una significativa resistencia a patógenos fúngicos.

Palabras clave: *Silybum marianum*, defensinas, péptidos antifúngicos, *Fusarium graminearum*.

Introducción

Como respuesta frente al ataque de un patógeno las plantas son capaces de producir una gran diversidad de factores de defensa dentro de los cuales se incluyen metabolitos secundarios y una amplia gama de proteínas y péptidos antimicrobianos—AMPs (Lacerda, Vasconcelos, Pelegrini, & Grossi de Sa, 2014). Los AMPs de plantas son ricos en cisteína y pertenecen a distintas familias (Astafieva et al., 2012). Una de esas familias está constituida por las defensinas.

Las defensinas vegetales son pequeñas proteínas catiónicas que se expresan de forma ubicua en el reino vegetal y se encuentran involucradas en la defensa inmune innata. Poseen un patrón conservado de 6 a 8 residuos de cisteína que pueden formar de tres a cuatro puentes disulfuro (Lacerda et al., 2014). Todas las defensinas vegetales comparten una estructura α/β común, estabilizada por al menos tres puentes disulfuro ($CS\alpha/\beta$).

La principal actividad reportada para las defensinas de plantas es la antifúngica, siendo activas en concentraciones micromolares (Kaur, Sagaram, & Shah, 2011; Hayes et al., 2013; Sagaram et al., 2013). Para estas moléculas también se ha demostrado la acción antibacteriana, antiprotozoario e insecticida, inhibitoria de

α -amilasa, de tripsina y de la síntesis de proteínas y bloqueo de canales iónicos (Lin et al., 2007; Nascimento et al., 2015; Van der Weerden & Anderson, 2013; Vijayan, Singh, Shukla, & Kirti, 2013).

Gracias al amplio espectro de actividad de las defensinas de plantas, la falta de mecanismos de resistencia microbiana y la alta eficacia en sistemas modelo, su falta de toxicidad y su efectividad in vivo, es que estas moléculas representen atractivas plantillas para el diseño de nuevos fármacos. Más aún, la actividad biológica de defensinas de plantas puede ser mejorada por alteraciones en las secuencias (Cools, Struyfs, Cammue, & Thevissen, 2017).

La región $CS\alpha\beta$, puede actuar como un andamiaje que incorpora una serie de regiones funcionales importantes en estas proteínas (Van der Weerden & Anderson, 2013; Vriens, Cammue, & Thevissen, 2014). El motivo altamente conservado denominado γ -core $[GXC(X_{3-9})C]$ con estructura de β hairpin presente en la región C-terminal de todas las defensinas y prácticamente en todas las clases de AMPs estabilizados por cisteína, contiene aminoácidos esenciales para la actividad antimicrobiana, funcionando como un factor de especificidad contra diferentes patógenos (Garrigues et al., 2017; Kaur et al., 2011; Lacerda et al., 2014; Sagaram et al., 2013; (Schmitt et al., 2016) Schmitt,

Rosa, & Destoumieux-Garzón, 2016). La importancia de este motivo en la actividad exhibida por las defensinas es debida a la presencia de residuos positivos en la región de giro, que interaccionarían con las cargas negativas de las paredes celulares o las membranas de los patógenos. Sagaram y colaboradores (2011) demostraron que también existe otro motivo importante para la actividad antifúngica en el caso de las defensinas MsDef1 (*Medicago sativa*) y MtDef4 (*Medicago truncatula*) denominado α -core cuya secuencia consenso es GXC(X₃₋₅)C. Este motivo se localiza en el loop ubicado entre una hoja β y la α -hélice y contiene parte de la hélice y, a diferencia del γ -core, carece de la estructura de β hairpin.

Hasta el momento, en nuestro grupo de trabajo, se clonaron dos defensinas (DefSm1D y DefSm2) de *Silybum marianum*, un cardo de la familia Asteraceae que crece en la Provincia de Buenos Aires. El análisis de ambas secuencias reveló la presencia de todos los residuos conservados entre las defensinas vegetales y homología con defensinas antifúngicas; más aún, DefSm2 posee el motivo γ -core idéntico a DmAMP1 de *Dahlia merckii*, este γ -core posee alta afinidad por distintos esfingolípidos presentes en la membrana plasmática de hongos blanco (Thevissen et al., 2003). Mediante la realización del

modelado molecular por homología hemos podido predecir la estructura tanto de DefSm1D como de DeSm2, las cuales poseen tres puentes disulfuro y la estructura característica CS α β . El estudio de la predicción funcional (realizada empleando como input los modelos tridimensionales obtenidos) a través del servidor ProFunc y los resultados del análisis de búsqueda de similitud secuencial mostraron que la función putativa de ambas sería la actividad antifúngica.

Los estudios de estructura proteica permiten predecir in silico actividades antimicrobianas, permitiendo de este modo diseñar péptidos basados en la secuencia y estructura primaria de la proteína. Péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de AMPs antifúngicos han permitido el mapeo de motivos antimicrobianos putativos y han mostrado actividad antifúngica por sí mismos (Sagaram, Pandurangi, Kaur, Smith, & Shah, 2011).

Objetivos

Los objetivos específicos son identificar y analizar motivos relacionados con la función antifúngica a partir de las secuencias de dos defensinas (DefSm1D y DefSm2), sintetizarlos químicamente y determinar su actividad contra *F. graminearum*. El objetivo general al cual

contribuyen estos objetivos específicos se orienta hacia la generación de conocimiento, el cual, en un futuro, pueda ser utilizado en la ingeniería de plantas con el fin de contribuir a una agricultura menos agresiva y más amigable con el medio ambiente.

Materiales y Métodos

Identificación de motivos antifúngicos a partir de las secuencias de las defensas DefSm1D y DefSm2

Para la identificación de estos motivos se partió de alineamientos múltiples de DefSm1 y DefSm2 con dominios tipo defensiva de plantas de las que se ha reportado la existencia de regiones importantes para la actividad antifúngica. Para el diseño se tuvieron en cuenta aquellos péptidos con alto *score* generados a través de la base de datos C-PAmP (Niarchou, Alexandridou, Athanasiadis, & Spyrou, 2013). C-PAmP permite la construcción de péptidos antimicrobianos pronosticados computacionalmente con alto puntaje o *score* para todas las especies de plantas disponibles en bases de datos. Los resultados obtenidos para las secuencias de defensas con alta identidad con DefSm1D y DefSm2 disponibles en dicha base de datos como Art v 1 de *Artemisia vulgaris*, AhAMP1 de *Aesculus hippocastanum* y DmAMP1 de *Dahlia*

merckii, así como los residuos importantes para la actividad antifúngica que ya han sido estudiados para Art v 1 y AhAMP1 (Fant, Vranken and Borremans, 1999; Himly *et al.*, 2002) se tuvieron en cuenta para el diseño final de los péptidos.

Síntesis química

Luego de identificar las secuencias potenciales de péptidos antifúngicos, las mismas se sintetizaron químicamente. La síntesis de los péptidos fue llevada a cabo por la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo, investigadora especializada en síntesis peptídica. La metodología empleada fue síntesis de péptidos en fase sólida con la estrategia Fmoc (Guzmán, Barberis, & Illanes, 2007).

Los péptidos fueron purificados mediante HPLC (columna C-18) y su masa molecular se determinó mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA).

Ensayos de actividad antifúngica

Se evaluó la capacidad de los péptidos sintéticos de inhibir el crecimiento del hongo filamentoso fitopatógeno *Fusarium graminearum* según la metodología descrita por Bleackley *et al.* (2017). Los aislamientos de *F. graminearum* se cultivaron durante 5 días en Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de cultivo de

esporulación de Capellini-Peterson a 25°C con agitación a 45 rpm. Los macroconidios se recolectaron centrifugando los cultivos obtenidos a 3.500 rpm y 2 °C durante 15 min. Las esporas decantadas se resuspendieron en medio de cultivo ½ PDB y se ajustó a $\approx 5 \times 10^4$ esporas.ml⁻¹ usando un hemocitómetro. 10 µl de los péptidos disueltos en agua fueron adicionados a pocillos de microplacas con 90 µl de la suspensión de esporas las que fueron incubadas durante 48 h a 25°C en oscuridad. Concentraciones empleadas para los péptidos 3248 y 3250: 40, 30, 25, 20, 25, 20, 8, 4 y 1 µM; 45, 34 y 11 µM para 3243; 84, 76, 63, 42 y 21 µM para 3245; y 50, 45 y 40 µM para 3246. Se realizó un control de esterilidad con 90 µl de ½ PDB y 10 µl agua y un control de crecimiento con 90 µl de la suspensión de esporas y 10 µl de agua. La germinación de las esporas se evaluó midiendo la DO595nm en lector de microplacas. La comparación de medias se realizó mediante el Test de Tukey (p<0,05).

Resultados y Discusión

Las búsquedas secuenciales por homología llevada a cabo utilizando el servidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) revelaron que tanto DefSm1D como DefSm2 presentan un alto grado de similitud con los dominios

defensina AhAMP1 (*Aesculus hippocastanum*), DmAMP1 (*Dhalia merckii*) y Art v 1 (*Artemisia vulgaris*). La Fig. 1 muestra el alineamiento entre las secuencias de estas proteínas.

A partir de la lista de potenciales péptidos antimicrobianos obtenidos de C-PamP empleando como input las secuencias de AhAMP1, DmAMP1 y Artv1 se seleccionaron aquellos con alto score. La localización de estos péptidos en relación con la proteína completa fue en la región N-terminal (α-core) o bien hacia la región C-terminal (γ-core). Teniendo en cuenta los péptidos generados en dichas regiones, se procedió a diseñar los péptidos potencialmente antimicrobianos para las secuencias de DefSm1D y DefSm2 (Fig. 2).

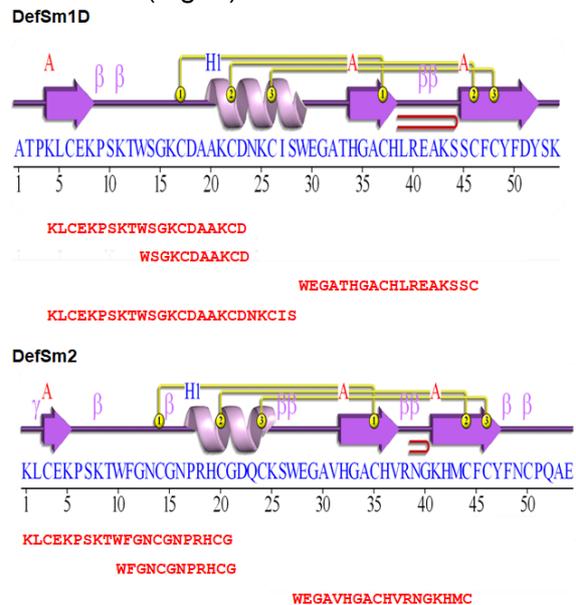


Fig. 2: Localización de los péptidos diseñados en relación con las secuencias de DefSm1D y DefSm2. Se muestra en azul la secuencia completa de cada una de las defensinas. Por encima de dicha secuencia se muestra la predicción de la estructura secundaria. Las flechas representan la posición de las hojas β y la hélice representa la posición del α-hélice. En amarillo se muestra la posición de los enlaces disulfuro. Por debajo, en color rojo, se muestran las secuencias de los potenciales péptidos antimicrobianos para cada una de las defensinas.

```

      *           20           *           40           *
DefSm1D : ATPKLCCEKPSKTWSGKCDAAKCD-AKCDNKCISWEGATHGACHLREAKSSCFCYFDYSK-- : 54
DefSm2  : ---KLCEKPSKTWFGNCGNPRHCGDCKSWEGAVHGACHVRNG-KHMCFCYFNCPQAE : 54
AhAMP1  : ---LCNERESCTWSGNCGNTAHCIDKCCQDWEKASHGACHKREN-HWKCFCYFNC---- : 50
DmAMP1  : ---ELCEKASKTWSGNCGNTGHCDNCKSWEGAAHGACHVRNG-KHMCFCYFNC---- : 50
Art v 1  : ---KLCEKTSKTYSGKCDN-KKCDKKCIEWEKACHGACHKREAGKESCFCYFDCD---- : 50
  
```

Fig. 1: Alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas de DefSm1D, DefSm2, AhAMP1 (Q7M1F3.1), DmAMP1 (P0C8Y4.1) y Art v 1 (Q84ZX5.1). Las secuencias fueron alineadas a través del ClustalW e importadas al programa GeneDoc. Se utilizaron cuatro niveles de conservación: 100% de conservación con fondo negro; 80% de conservación con fondo gris y letra blanca; 60% de conservación fondo gris con letra negra y menor al 60% de conservación con fondo blanco.

Se diseñaron cuatro péptidos a partir de la secuencia DefSm1D (tres en la región α -core y uno en la región del γ -core) y tres derivados de la defensina DefSm2 (dos en la región α -core y uno en la región del γ -core). A continuación se realizó la síntesis química de dichos péptidos, resultando sólo la síntesis de tres péptidos para DefSm1D (llamados 3243, 3245 y 3246) y dos para DefSm2 (denominados 3248 y 3250). La Fig. 3 muestra la ubicación de los mismos sobre la estructura terciaria de cada defensina.

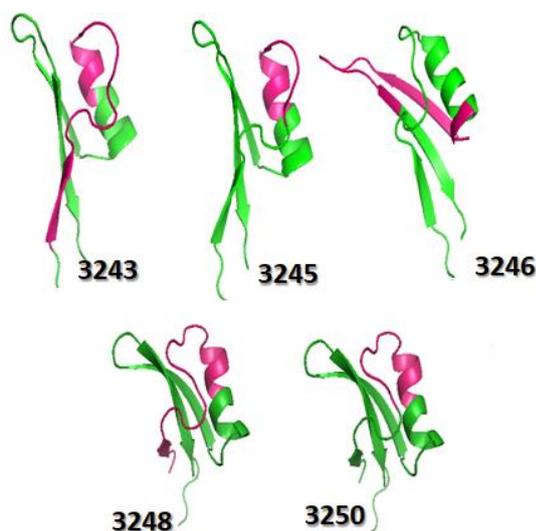


Fig. 3: Localización en la estructura tridimensional de DefSm1D de los péptidos (3243, 3245 y 3246) y de DefSm2 (3248 y 3250). En color rosa se muestra la localización de los respectivos péptidos.

Las secuencias y características de los péptidos finalmente sintetizados, purificados por HPLC y caracterizados por espectrometría de masas se muestran en la Tabla 1.

Para los péptidos derivados de DefSm1D no se observaron diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0,05$). En el caso de los péptidos 3248 y 3250 sí se observaron diferencias significativas con el control de crecimiento, observándose inhibición completa del crecimiento de *F. graminearum* con el péptido 3248 a una concentración de 40 μ M.

Péptido	Nombre	Mw (Da)	Mw (predicted)*	pI
DefSm1D				
KL CEKPSKT WSGK CDAAKCD	3243	2197.6	2.2 kDa	8,51
W SGKCDAAKCD	3245	1182.3	1.18 kDa	6,18
W EGATHGACHLREAKSSC	3246	1942.2	1.94 kDa	7,42
DefSm2				
KL CEKPSKT WFGNCGN PRHCG	3248	2361.7	2.36 kDa	8,98
W FGNCGNPRHCG	3250	1346.5	1.35 kDa	8,24

* Protein Molecular Weight SMS

Azul: residuos básicos
Rojo: residuos ácidos
Verde: residuos hidrofóbicos sin carga
Negro: Otros residuos

Tabla 1. Secuencia y características de los péptidos sintetizados.

La Fig. 4 muestra la representación de la DO595 nm vs la concentración de péptido. La tendencia general en ambos casos muestra una disminución en la DO595 nm

a medida que aumenta la concentración del péptido.

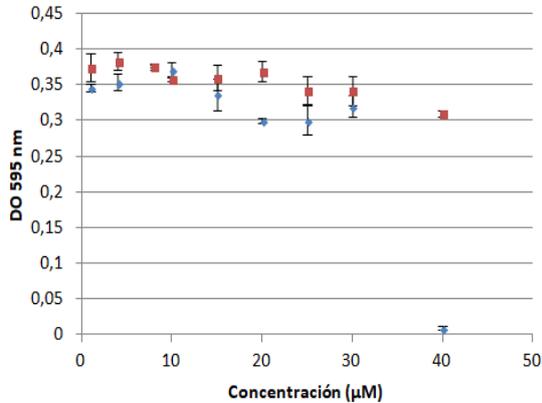


Fig. 4: DO595 nm en función de la concentración de péptido 3248 (azul) o 3250 (rojo).

También se realizó el seguimiento de la DO595 nm en función del tiempo para evaluar el crecimiento del hongo (Fig 5). Se graficaron las curvas de crecimiento correspondiente a las concentraciones de aquellos péptidos que mostraron diferencias significativas con el control de crecimiento ($p < 0,05$).

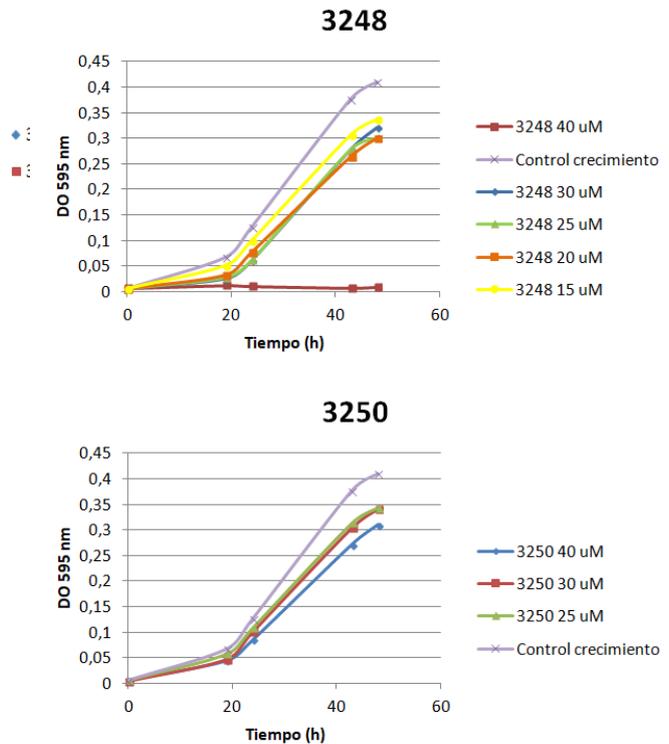


Fig. 5: Curvas de crecimiento de *F. graminearum* para distintas concentraciones de los péptidos 3248 y 3250.

Conclusiones

En este trabajo, se diseñaron y sintetizaron cinco péptidos potencialmente antifúngicos empleando como plantilla la secuencia de dos defensinas de *S. marianum* previamente clonadas en nuestro laboratorio. Dos de dichos péptidos, denominados 3248 y 3250 derivados de la región α -core de DefSm2, resultaron activos contra el hongo fitopatógeno *F. graminearum*. Adicionalmente, el péptido 3248 inhibió

completamente el crecimiento del hongo, impidiendo la germinación de los conidios.

Bibliografía

Astafieva, a a, Rogozhin, E. a, Odintsova, T. I., Khadeeva, N. V, Grishin, E. V, & Egorov, T. a. (2012). Discovery of novel antimicrobial peptides with unusual cysteine motifs in dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Peptides*, 36(2), 266–71.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.009>

Bleackley, M. R., Dawson, C. S., Mckenna, J. A., Quimbar, P., Hayes, B. M. E., Weerden, N. L. Van Der, & Anderson, M. A. (2017). crossm Synergistic Activity between Two Antifungal Proteins , the Plant Defensin, 2(5), 1–12.

Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2017). Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*, 12, 441–454.

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

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19991115\)37:3<388::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19991115)37:3<388::AID-)

PROT7>3.0.CO;2-F

Garrigues, S., Gandía, M., Borics, A., Marx, F., Manzanares, P., & Marcos, J. F. (2017). Mapping and identification of antifungal peptides in the putative antifungal protein AfpB from the filamentous fungus *Penicillium digitatum*. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00592>

Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: Chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 279–314. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-13>

Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A., & Van Der Weerden, N. L. (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin nad1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3667–3675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-13>

Himly, M., Jahn-schmid, B., Dedic, A., Kelemen, P., Wopfner, N., Altmann, F., ... Ebner, C. (2002). Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *The FEBS Journal*, (1).

Kaur, J., Sagaram, U. S., & Shah, D. (2011). Can plant defensins be used to

engineer durable commercially useful
fungal resistance in crop plants? *Fungal
Biology Reviews*, 25(3), 128–35.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.07.004>

Lacerda, A. F., Vasconcelos, E. a R.,
Pelegri, P. B., & Grossi de Sa, M. F.
(2014). Antifungal defensins and their role
in plant defense. *Frontiers in Microbiology*,
5(April), 116.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>

Lin, K., Lee, T.-R., Tsai, P.-H., Hsu, M.-P.,
Chen, C.-S., & Lyu, P.-C. (2007).
Structure-based protein engineering for
alpha-amylase inhibitory activity of plant
defensin. *Proteins: Structure, Function and
Bioinformatics*, 68(December 2006), 530–
540. <https://doi.org/10.1002/prot>

Nascimento, V. V., de Mello, E. O.,
Carvalho, L. P., de Melo, J. T., Carvlho, A.
de O., Fernandes, K. V. S., & Gomes, V.
M. (2015). PvD1 defensin , a plant
antimicrobial peptide with inhibitory activity
against *Leishmania amazonensis*.
Bioscience Reports, 35(5), 1–7.
<https://doi.org/10.1042/BSR20150060>

Niarchou, A., Alexandridou, A.,
Athanasiadis, E., & Spyrou, G. (2013). C-
PAMP: Large scale analysis and database
construction containing high scoring
computationally predicted antimicrobial
peptides for all the available plant species.
PLoS ONE, 8(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.00797>

28

Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko,
G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi,
R. S., ... Shah, D. M. (2013). Structural
and functional studies of a phosphatidic
acid-binding antifungal plant defensin
MtDef4: Identification of an RGFRRR motif
governing fungal cell entry. *PLoS ONE*,
8(12), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.00824>
85

Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J.,
Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011).
Structure-activity determinants in
antifungal plant defensins MsDef1 and
MtDef4 with different modes of action
against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*,
6(4), e18550.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.00185>
50

Schmitt, P., Rosa, R. D., & Destoumieux-
Garzón, D. (2016). An intimate link
between antimicrobial peptide sequence
diversity and binding to essential
components of bacterial membranes.
*Biochimica et Biophysica Acta -
Biomembranes*, 1858(5), 958–970.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10>
011

Thevissen, K., François, I. E. J. a,
Takemoto, J. Y., Ferket, K. K. a, Meert, E.
M. K., & Cammue, B. P. a. (2003).
DmAMP1, an antifungal plant defensin

from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 226(1), 169–173.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00590-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00590-1)

Van der Weerden, N. L., & Anderson, M. a. (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 121–131.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>

Vijayan, S., Singh, N. K., Shukla, P., & Kirti, P. B. (2013). Defensin (TvD1) from *Tephrosia villosa* exhibited strong anti-insect and anti-fungal activities in transgenic tobacco plants. *Journal of Pest Science*, 86(2), 337–344.
<https://doi.org/10.1007/s10340-012-0467-5>

Vriens, K., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 12280–303.

<https://doi.org/10.3390/molecules190812280>

80

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. María Laura Colombo por la excelente asistencia técnica y a la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo quien llevó a cabo la síntesis peptídica.