

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Expresión y análisis de actividad biológica de  
un péptido antimicrobiano Protegrina-1  
producido en tabaco por dos sistemas de  
transformación genética”**

Tesis que presenta

**Omar Patiño Rodríguez**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2013

---



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión y análisis de actividad biológica de un péptido antimicrobiano Protegrina-1 producido en tabaco por dos sistemas de transformación genética**” presentada para obtener el Grado de de Doctor en Ciencias en Biología Molecular, fue elaborada por **Omar Patiño Rodríguez** y aprobada el **30 de Agosto de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

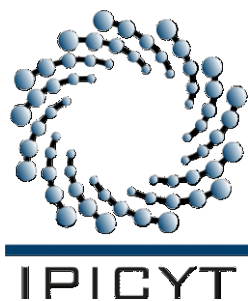
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
(Director de la tesis)

Dra. Irene Castaño Navarro  
(Asesor de la tesis)

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga  
(Asesor de la tesis)

Dr. Roberto Montes de Oca Luna  
(Asesor de la tesis)

Dr. Schuyler S. Korban  
(Asesor de la tesis)



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 232052 y el apoyo de los proyectos de Ciencia Básica 37048-B, 56980 y 154790 y la Fundación Produce SLP.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

Fotografía

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 059 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de agosto del año 2013, se reunió a las 16:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT
Dr. Roberto Montes de Oca Luna	Sinodal externo	UANL
Dr. Schuyler Safi Korban	Sinodal externo	UIUC

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Omar Patiño Rodríguez**

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión y análisis de actividad biológica de un péptido antimicrobiano Protegrina-1 producido en tabaco por dos sistemas de transformación genética*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convenga, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de agosto de 2013.

  
Dr. Marcial Bonilla Marín  
Secretario Académico



  
Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez  
Jefa del Departamento del Posgrado

---

## DEDICATORIAS

*“Quisiera dedicar el fruto de mi trabajo a Dios que me ha permitido la vida y continuar en lo que más me gusta hacer, a mi esposa Aída que ha sido mi compañera en las buenas y en las malas, así como a toda mi familia que me ha apoyado y creído en mí”*

---

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial quisiera agradecer al **Dr. Ángel G. Alpuche Solís**, por haberme permitido estar en su distinguido grupo de trabajo así como brindarme su apoyo para realizar mi maestría, ya que aprendí grandes cosas que me han ayudado a madurar personal y académicamente. A la **Dra. Irene Castaño Navarro, Dr. Gerardo Argüello Astorga, Dr. Francisco Jiménez Bremont**, por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles, así como sus consejos que me guiaron por el camino correcto. Al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna**, por sus comentarios y sugerencias que contribuyeron a mi formación académica y científica.

A los técnicos del laboratorio: **Rosalba Castillo** y **Salvador Ambriz**, por su ayuda y amistad, al igual que a **Vero Zarate** y a **Elvira Hernández**.

A mis compañeros, que con su apoyo y consejos me permitieron lograr terminar mi trabajo: **Lourdes Enriquez, Victoria Lima, Luzmila Martínez, Karla Sanchez, Benita Ortega, Lilia Montoya, Verónica Márquez** y **Mayra Esparza**.

A todos mis compañeros del laboratorio 1 que hacían del trabajo algo muy divertido y ameno: **Bernardo Bañuelos, Armando Mauricio, Mariana Cantú, Aurora Londoño, Yair Cárdenas, Sra. Rosa Maria Cruz**.

---

# Contenido

<b>Constancia de aprobación.....</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos institucionales.....</b>	<b>iii</b>
<b>Acta de examen.....</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatorias.....</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedades infecciosas como problema de salud pública	2
1.2 Resistencia a antibióticos y problemas para controlar infecciones	3
1.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas	4
1.3.1 Catelicidinas	5
1.3.1.1 Protegrinas	6
1.4 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	9
1.4.1 Especificidad de los péptidos antimicrobianos	10
1.5 Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos	11
1.6 Uso de la agrobiotecnología para la expresión de proteínas recombinantes en plantas	12
1.7 Métodos de producción de proteínas recombinantes en plantas	12
1.7.1 Expresión transitoria de proteínas, usando vectores virales desarmados	13
1.7.2 Transformación de cloroplastos por el método de biobalística	15
<b>II. OBJETIVO</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo general	18
.	18

---

2.2 Objetivos específicos	
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
4.1 Esterilización y germinación de semillas	22
4.2 Métodos de transformación en plantas	22
4.2.1 Ensayos de transformación transitoria con vectores virales por medio de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
4.2.1.1 Ensayos de “Magnifection”	22
4.2.2 Transformación de cloroplastos de tabaco mediante biobalística	23
4.2.2.1 Preparación de la suspensión de micropartículas de oro	23
4.2.2.2 Preparación de material para el bombardeo	24
4.2.2.3 Cobertura de microacarreadores con ADN	24
4.2.2.4 Preparación del material biológico	24
4.2.2.5 Bombardeo del material biológico de tabaco	25
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. CAPÍTULO 1: EXPRESIÓN DE LA PROTEGRINA-1 POR TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA USANDO VECTORES VIRALES EN TABACO</b>	26
5.1 Subclonación del gen de interés en vectores virales para la expresión transitoria en hojas de tabaco	27
5.2 Estandarización de la metodología de “Magnifection” con la proteína verde fluorescente (GFP) en <i>Nicotiana benthamina</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	29
5.3 Expresión transitoria de la protegrina-1 con la metodología de “Magnifection” en <i>Nicotiana tabacum</i> que produce bajo contenido de alcaloides	32
5.3.1 Detección del replicón viral por RT-PCR en los tabacos infiltrados	32
5.3.2 Análisis por Northern blot de los tabacos infiltrados	34
5.3.3 Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados	35
5.3.4 Análisis antimicrobianos de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados y estimación de la concentración de la protegrina-1 producida	36
	43



---

<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. CAPÍTULO 2: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS DE TABACO</b>	
6.1 Construcción de vectores bicistrónicos para bombardeo de tabaco	43
6.2 Transformación de cloroplastos de tabaco	44
6.3 Análisis por PCR de los brotes transformantes	47
6.4 Obtención de la línea T1 y experimento de germinación en agente de selección	46
6.5 Análisis de Southern blot de los tabacos transplastómicos	50
6.6 Análisis de RT-PCR de los tabacos transplastómicos	52
6.7 Detección de la proteína recombinante	53
6.7.1 Análisis de SDS-PAGE de los tabacos transplastómicos	53
6.7.2 Análisis de Western blot de los tabacos transplastómicos	54
6.8 Ensayos de actividad antimicrobiana	56
6.8.1 Ensayos antimicrobianos con los extractos proteicos de los tabacos transplastómicos contra patógenos de humanos	56
6.8.2 Ensayos antimicrobianos con los extractos proteicos de los tabacos transplastómicos contra patógenos de plantas	60
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	63
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	65
<b>IX. ANEXO I.</b> Artículo publicado en “Plant Cell, Tissue and Organ Culture” titulado “Transient expression and characterization of the antimicrobial peptide Protegrin-1 in <i>Nicotiana tabacum</i> for control of bacterial and fungal mammalian pathogens”	73
<b>X. ANEXO II.</b> Protocolos.	74
10.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo	75
10.1.1 Medios de cultivo para plantas	75
10.1.2 Vitaminas para medios de cultivo	77
10.1.3 Preparación de antibióticos, reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes	77
10.1.3.1 Antibióticos	78
	78

---

10.1.3.2 Reguladores de crecimiento	
10.1.4 Preparación de medios de cultivo para bacterias	78
10.1.5 Preparación de soluciones	78
10.2 Soluciones Bradford para cuantificación de proteínas	79
10.3 Aislamiento y purificación de ADN	79
10.3.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	79
10.3.4 Extracción de ADN de plantas	81
10.4 Métodos de cuantificación de ADN	81
10.5 Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	82
10.6 Manipulación enzimática del ADN	84
10.6.1 Digestión para caracterización de clonas positivas	84
10.6.1.2 Purificación de fragmentos de ADN, a partir de un producto de digestión	84
10.6.2 Reacciones para generar extremos romos	84
10.6.3 Reacciones de ligación y purificación	85
10.7 Transformación de <i>E. coli</i> con los plásmidos recombinantes	85
10.7.1 Preparación de células calcio competentes	85
10.7.2 Método de transformación mediante choque térmico	86
10.8 Análisis por Southern blot	86
10.9 Análisis por Western blot	88
10.10 Análisis por RT-PCR	89
10.11 Análisis por Northern blot	89
10.12 Análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas totales solubles	90
10.12.1 Condiciones de electroforesis	91
10.12.2 Tinción de los geles con azul de Coomasie	91
10.15 Ensayos de actividad biológica	92
10.15.1 Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales	92
10.15.2 Ensayos de inhibición bacteriana en placa	92
	18

---

10.15.3 Ensayos de inhibición bacteriana en medio líquido contando unidades formadoras de colonias (UFC)

---

## Lista de Figuras:

Figura 1. Aparición y reaparición de enfermedades infecciosas WHO (2004).	3
Figura 2. Ilustración de productos génicos de catelicidinas.	6
Figura 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.	9
Figura 4. Representación esquemática de la especificidad de los péptidos antimicrobianos.	11
Figura 5. Representación esquemática de la tecnología de expresión transitoria llamada “Magnifection”.	14
Figura 6. Secuencia de la Protegrina-1 y vectores usados para la transformación transitoria.	28
Figura 7. Expresión de GFP por la metodología de “Magnifection” usando como módulo 3’ el vector pICHGFP en <i>Nicotiana benthamina</i> .	30
Figura 8. Expresión de GFP por la metodología de “Magnifection” usando como módulo 3’ el vector pICHGFP en <i>Nicotiana tabacum</i> variedad que produce bajo nivel de alcaloides.	31
Figura 9. Ensayos de RT-PCR de los tabacos infiltrados.	33
Figura 10. Detección del replicón viral de ARN por Northern blot.	34
Figura 11. Análisis de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados con el módulo 3’ con la protegrina-1.	35
Figura 12. Curva dosis-respuesta de protegrina-1 sobre tres cepas bacterianas.	37
Figura 13. Mapa físico del vector bicistrónico pKCZ-UbPG1.	43
Figura 14. Diagrama general de la recombinación homóloga en cloroplastos.	44
Figura 15. Plantas transplastómicas de tabaco.	46
Figura 16. Análisis de PCR de los tabacos transplastómicos.	48
Figura 17. Experimento de germinación de las semillas en medio MS0 con espectinomycin (50 mg/L).	49
Figura 18. Análisis de Southern blot para detección del gen de la	51

---

protegrina-1.

Figura 19. Análisis de RT-PCR de las líneas transplastómicas de tabaco que expresan la protegrina 1.	53
Figura 20. Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de PST de tres de las líneas transplastómicas y una silvestre (WT).	54
Figura 21. Análisis de Western blot del extracto proteico de la línea transplastómica LT1 y del extracto proteico de la línea silvestre.	55
Figura 22. Ensayos antimicrobianos contra patógenos de humano.	58
Figura 23. Ensayos antimicrobianos contra <i>Mycobacterium bovis</i> usando 100 µg de PTS.	59
Figura 24. Ensayo antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>Clavibacter michiganensis</i> sub. <i>michiganensis</i> (cepa IFO).	61
Figura 25. Ensayos <i>in vivo</i> de resistencia a <i>Clavibacter michiganensis</i> con los tabacos transplastómicos que expresan la protegrina-1.	62

---

**Lista de tablas:**

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de las protegrinas.	8
Tabla 2. Actividad antimicrobiana del extracto proteico de las plantas infiltradas con PICHPG1.	38

---

## RESUMEN

### **Expresión y análisis de actividad biológica de un péptido antimicrobiano Protegrina-1 producido en tabaco por dos sistemas de transformación genética**

El uso inadecuado de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas se está convirtiendo en un problema de salud pública, al favorecer la emergencia de cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos de uso común. Por lo tanto, los antibióticos alternativos son esenciales para estos tratamientos. Los péptidos antimicrobianos, como la protegrina-1 (PG-1), son una interesante alternativa para hacer frente a este problema. La PG-1 es un péptido antimicrobiano de amplio espectro de origen porcino. En este estudio, se utilizó un sistema de expresión transitoria llamado magnICON, así como la transformación de cloroplastos, con el fin de expresar PG-1 en tabaco (*Nicotiana tabacum*). En los experimentos de magnICON se utilizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar el replicón viral activo, generando un amplicón de 290 pb, en tanto que en el análisis de transferencia de ARN por la técnica de Northern blot se detectó un producto de 6.1 kb. El análisis de proteína soluble total por medio de geles de SDS/PAGE reveló la presencia de una banda correspondiente al peso molecular de la PG-1 (2.1 kDa), que estaba ausente en el extracto silvestre de tabaco. Se realizaron ensayos antimicrobianos usando el extracto de proteínas de tabaco transformadas transitoriamente, los cuales demostraron que la actividad del péptido (PG-1) en los tejidos de la planta era factible y contribuyó a la inhibición de 53.2% de *Klebsiella pneumoniae*, 70.2% de *Staphylococcus aureus*, 56.6 % de *Escherichia coli*, 72% de *Mycobacterium bovis* BCG, y 70% de los cultivos de *Candida albicans*, lo cual no se detectó en extractos silvestres de tabaco. Además se expresó la protegrina-1 (PG1) por biobalística en cloroplasto de tabaco. Se usó un vector bicistrónico modificado a partir del vector pKCZ, con el promotor *Prrn* y la región 5'UTR de la proteína 10 del fago T7, así como el gen de PG-1 fusionado traduccionalmente a la ubiquitina (Ub::PG-1). El gen (*aadA*) se incluyó como un marcador de selección. Se bombardearon hojas jóvenes de tabaco, y tras dos rondas de selección se obtuvieron probables plantas transplastómicas que fueron evaluadas por RT-PCR para confirmar la transcripción del transgén. La producción del péptido Ub::PG-1 se confirmó por ensayos de Western-blot usando un anticuerpo anti-ubiquitina. El extracto proteico redujo el crecimiento de los cultivos de *K. pneumoniae* en un 87.5%, de *S. aureus* en un 78.7%, de *E. coli* en un 66.8%, de *M. bovis* en un 88.8% y de *Clavibacter michiganensis* (*Cmm*) en un 57.8%. Además, se realizó un ensayo de infección contra *Cmm* en plantas de tabaco transplastómicas que expresan la PG-1; los resultados mostraron una clara disminución de los síntomas desarrollados, en comparación con la planta silvestre. Por lo tanto, la PG-1 producida tanto en células de plantas de tabaco infiltradas como en cloroplastos transformados, es funcionalmente activa y capaz de reducir el crecimiento de varios patógenos humanos y de plantas.

Palabras clave: Protegrina-1, Tabaco, magnICON, Biobalística, Transplastómicas

---

## ABSTRACT

### **Expression and analysis of biological activity of an antimicrobial peptide protegrin-1 produced in tobacco by two genetic transformation systems**

Mammalian infectious diseases are widespread, and some are becoming difficult to control due to inappropriate use of antibiotics. This has contributed to the incidence of bacterial strains with resistance to commonly used antibiotics. Thus, effective alternative antibiotics are essential for treatment of infectious diseases. Antimicrobial peptides are viable alternatives to address this problem. Among those, protegrin-1 (PG-1) is a broad-spectrum antimicrobial peptide. In this study, a magnICON and chloroplast transformation systems were used to express the PG-1 peptide in *Nicotiana tabacum*. For the transient expression system mediated by *Agrobacterium* (magnICON), reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot analyses of transformed *N. tabacum* were employed to detect viral replicons, 290 bp and 6.1 kb. SDS/PAGE revealed the presence of a band corresponding to the molecular weight of PG-1 (2.1 kDa), which was absent in wild-type *N. tabacum*. Antimicrobial/antifungal assays of protein extracts from transiently transformed *N. tabacum* were performed, and these demonstrated that PG-1 peptide activity in these plant tissues was viable and contributed to inhibition of 53.2 % of *Klebsiella pneumoniae*, 70.2 % of *Staphylococcus aureus*, 56.6 % of *Escherichia coli*, 72 % of *Mycobacterium bovis* BCG, and 70 % of *Candida albicans* cultures. No inhibition of any of these fungal and bacterial pathogens was detected when wild-type *N. tabacum* extracts were used. In addition we expressed the protegrin-1 (PG1) encoded by a synthetic gene optimized in its codon-usage for tobacco chloroplast expression (*N. tabacum* var. Petit Havana), using a biolistic method. A bicistronic vector modified from pKCZ was obtained with the *Prrn* promoter and 5'UTR region of the protein 10 from phage T7, as well as the Protegrin-1 (PG-1) gene fused to ubiquitin. The (*aadA*) gene was included as a selection marker. Particle bombardment was used in tobacco young leaves and after two rounds of selection, transplastomic plants were obtained. Putative transplastomic lines were evaluated by RT-PCR. The presence of ubiquitin-protegrin protein production was confirmed by Western-blot assay. The protein extract reduced the growth cultures of *K. pneumoniae* 87.5%, *S. aureus* 78.7%, *E. coli* 66.8%, *M. bovis* 88.8% and *Clavibacter michiganensis* (*Cmm*) 57.8%. The preliminary results suggest that the Protegrin-1 produced in tobacco chloroplasts is processed and is functionally active against human and plant pathogens as is shown in the *in vitro* assays. In addition an infection assay with the plant pathogen *Cmm* was performed using transplastomic tobacco plants expressing the PG-1, resulting in a decrease of symptoms developed in comparison to the wild-type tobacco plant. Therefore, PG-1 produced both in plant cells of infiltrated tobacco and chloroplast transformed, was active and controlled growth of several bacterial and fungal human pathogens.

Key words: Protegrin-1, Tobacco, magnICON, biolistic, Transplastomic.



---

# I. INTRODUCCIÓN

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedades infecciosas como problema de salud pública

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las primeras causas de muerte a escala mundial al final del milenio (Wong y col., 1991). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cerca de 13.3 millones de personas están afectadas por enfermedades diversas, dentro de las que destacan las infecciones de las vías respiratorias, VIH/SIDA, enfermedades diarreicas, tuberculosis y malaria, entre otras (WHO, 2004). La incidencia de estas enfermedades ha aumentado considerablemente debido al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, lo cual resulta en un aumento en el número de cepas resistentes a una gran variedad de antibióticos; por otro lado, un amplio número de especies bacterianas son capaces de intercambiar la información genética necesaria para contrarrestar altas concentraciones de compuestos antimicrobianos (Lapeña, 1999; Martel y col., 2000).

Los grupos de población con mayor riesgo de sufrir infecciones graves son los individuos inmuno-deprimidos, las personas de la tercera edad, los pacientes internados en hospitales y asilos, así como las personas con escaso o nulo acceso a la atención sanitaria, como vagabundos, trabajadores agrícolas y colectivos de bajo estatus socioeconómico (Gestal-Otero, 1997).

El incremento en enfermedades infecciosas repercute en un mayor gasto en la salud pública a nivel nacional, y conduce a un uso inadecuado de los recursos destinados a prevenir y combatir dichas enfermedades. En general, las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa de muerte en países en desarrollo y la principal razón es la aparición y reaparición de las enfermedades (Fig. 1).



**Figura 1.** Aparición y reaparición de enfermedades infecciosas WHO (2004).

## 1.2 Resistencia a antibióticos y problemas para controlar infecciones

Los antibióticos ocupan el segundo lugar en la lista de medicamentos más usados después de los analgésicos a nivel mundial. Su uso excesivo, y en muchos casos inapropiado, en medicina, veterinaria y agricultura, ha dado lugar a un rápido aumento en la prevalencia de microorganismos resistentes a los medicamentos. Actualmente, muchos de los antiguos antibióticos han dejado de ser eficaces o lo son en menor grado que antes (Lapeña, 1999; Martel y col., 2000).

La tolerancia a los antibióticos se desarrolla por selección y la transferencia vertical y horizontal de características genéticas de resistencia entre las bacterias de la misma o diferentes especies. Por lo general, cuanto más se usa un antibiótico específico, mayor es el riesgo de que surja y se extienda la resistencia al mismo, y por consiguiente, que sea cada vez menos eficaz. Para evitar una resistencia de este tipo, se han desarrollado nuevos antibióticos con propiedades químicas similares, pero no idénticas, llamados de segunda o tercera generación; sin embargo, a un mediano plazo puede surgir resistencia a estos medicamentos (Gestal- Otero, 1997). La consecuencia más grave de esta estrategia, es la aparición de nuevas cepas bacterianas

---

resistentes a diversos antibióticos del mismo tipo. El peor escenario es que los agentes patógenos peligrosos adquieran con el tiempo resistencia a todos los antibióticos hasta ahora eficaces, lo que daría lugar a epidemias incontrolables de enfermedades microbianas imposibles de tratar.

Por tal motivo, resulta indispensable desarrollar nuevas estrategias para asegurar la disponibilidad de tratamientos eficaces contra infecciones microbianas agresivas. Del mismo modo, es esencial que los nuevos medicamentos, al igual que los anteriores, se usen de una manera más restringida y siempre apoyada en sólidos conocimientos médicos. Además, muchos antibióticos son compuestos químicos estables que no se descomponen en el cuerpo y que permanecen activos después de su excreción. En la actualidad, los antibióticos contribuyen considerablemente al creciente problema de las sustancias médicas activas presentes en el medio ambiente (Gestal-Otero, 1997). La Secretaría de Salud (SS, 2010) prohibió la venta de antibióticos sin receta médica (Ley General de Salud, artículos 226 y 227), disposición que entró en vigor el día 25 de Agosto del año 2010, lo cual corresponde a una acción preventiva para la generación de nuevas cepas resistentes a antibióticos, sin embargo, ya existen una gran cantidad de cepas bacterianas capaces de resistir a una variedad de antibióticos, lo cual resulta en un serio problema de salud pública.

### **1.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas**

Alexander Fleming fue el primero en observar que las secreciones lagrimales tenían poderes bactericidas. La lisozima resultó ser la causante de esta actividad y la primera proteína antimicrobiana registrada; desde entonces se han encontrado otras proteínas y péptidos que tienen función antimicrobiana (Fleming, 1950).

Se considera que los péptidos antimicrobianos existen desde el inicio de la evolución de la respuesta inmune. Su amplia distribución en el reino animal y vegetal demuestra que constituyen una parte esencial de la inmunidad de los organismos multicelulares (Lehrer y col., 1993; Zasloff, 2002).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas (Bruno y col., 2006), que difieren en tamaño,

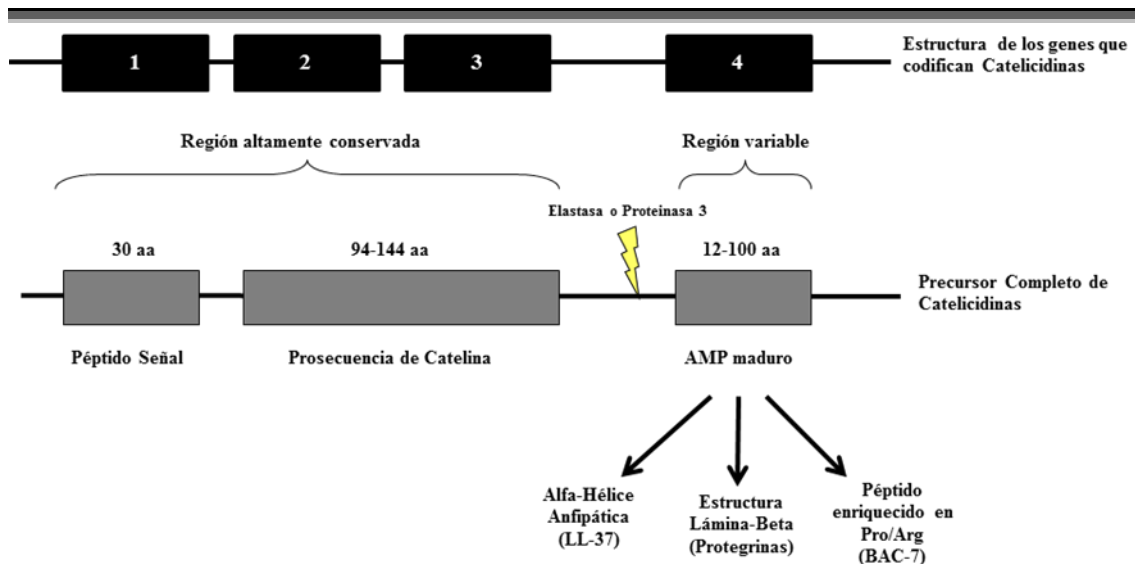
---

secuencia de aminoácidos y estructura; así mismo, todos están genéticamente codificados, es decir, para cada péptido antimicrobiano existe un gen específico, independientemente de que éstos puedan tener alguna modificación postraducciona como es el caso de las catelicidinas y las  $\alpha$ -defensinas (Boman, 1995; Zasloff, 2002). Los péptidos antimicrobianos se agrupan en familias de acuerdo con su tamaño, su estructura y la organización de los aminoácidos. En humanos, existen tres familias: defensinas, catelicidinas e histatinas de las cuales las más importantes son las catelicidinas y defensinas (Kaiser y Diamond, 2000). Estos péptidos tienen carga positiva neta debido a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos (lisina y arginina), y además, cerca del 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Ganz y col., 1985; Boman, 1995).

### **1.3.1 Catelicidinas**

En 1995, Zannetti descubrió en bovinos y cerdos un grupo de péptidos antimicrobianos diferentes a los conocidos previamente, y los nombró catelicidinas, que actualmente se conocen con el nombre de Protegrinas (PG) en cerdos, y LL-37 en humanos. Estas catelicidinas son multifuncionales y tienen una clara importancia para la respuesta inmune del hospedero (Zannetti y col., 1995). En la actualidad se han encontrado derivados de catelicidinas en gatos, conejos, cabras y ratones (Turner y col., 1998; Wu y col., 1999; Nizet y Gallo, 2003). Los genes de las catelicidinas son muy conservados y contienen 4 exones y tres intrones; los primeros 3 exones corresponden a una secuencia señal y un propéptido, el cuarto exón es muy variable y corresponde al dominio con propiedades antimicrobianas (Shinnar y col., 2003).

Los prepropéptidos son sintetizados en médula ósea, en las células precursoras de los neutrófilos donde se almacenan como propéptidos. Como se muestra en la Figura 2, los propéptidos se activan con la desgranulación de los neutrófilos, que liberan proteinasa 3 en humanos o elastasa en cerdos, para finalmente liberar un péptido antimicrobiano que puede adoptar una estructura de  $\alpha$ -hélice como LL-37/hCAP-18 en humanos (Turner y col., 1998), de lámina  $\beta$ -plegada, como las protegrinas de cerdos (Shi y Ganz, 1998), o ser ricos en aminoácidos de prolina y arginina como Bac7 de bovinos (Zanetti y col., 1995).



**Figura 2.** Ilustración de productos génicos de catelicidinas. El precursor inactivo corresponde al prepropéptido, una vez en los granulocitos se almacena como un propéptido inactivo, el cual al ser activado por la serin-proteasa 3 ó la elastasa liberan el dominio de catelicidina y dejan activo al péptido antimicrobiano. Imagen modificada Nizet y Gallo (2003).

### 1.3.1.1 Protegrinas

Las protegrinas (PG) <latín *protegere*>, son péptidos de la familia de las catelicidinas, ricos en arginina y cisteína, tienen entre 16 a 18 residuos con una parte carboxi-terminal amidada. Su estructura es  $\beta$ -plegada, con dos puentes disulfuro y se encuentran presentes en neutrófilos de cerdo (*Sus scrofa*). A la fecha se han identificado 5 protegrinas naturales en cerdos, con un amplio espectro de acción que abarca principalmente a bacterias y hongos (Zhao y col., 1995; Mangoni y col., 1996).

A diferencia de las defensinas de humanos, las PGs conservan su actividad en presencia de NaCl (a concentraciones fisiológicas) así como de cationes divalentes (Shi y Ganz, 1998). Otra ventaja interesante es que algunos inhibidores de péptidos antimicrobianos presentes en el suero humano, como  $\alpha$ -macroglobulinas y serpinas, tienen poco efecto inhibitorio en las protegrinas. Conservan su actividad en un amplio rango de pH; a diferencia de las defensinas de humanos y conejos cuyo pH óptimo es entre 6.5 y 7.5, las protegrinas son activas a pH 4.5 contra bacterias ácido tolerantes Gram-negativas, o levaduras (Bellm y col., 2000). Las protegrinas naturales son activas a concentraciones micromolares, sin embargo, a concentraciones muy altas pueden generar actividad hemolítica contra eritrocitos de humanos. Por esta razón se han generado cientos de análogos de PGs con modificaciones en

la quiralidad, la longitud y conformación del péptido, el estado de amidación y los puentes disulfuro (Chen y col., 2000). La Tabla 1 resume la actividad antimicrobiana de las protegrinas (tomada de Herrera-Díaz, 2005).

El amplio espectro de acción de las protegrinas contra agentes infecciosos, además de su eficacia para matar microorganismos de interés biomédico y su actividad en presencia de fluidos biológicos, las ubica como potentes antimicrobianos (Bellm y col., 2000). Sin embargo, aún cuando se han realizado numerosos estudios de este grupo de péptidos, sólo se tienen pocos reportes de su actividad antimicrobiana, contra microorganismos fitopatógenos. En un estudio de Kamysz y col. (2003) se reportó actividad antimicrobiana contra diferentes patovarietades de *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) y *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi* Dickeya sp), de igual forma Seung-Bum y col., 2010, confirman la actividad antimicrobiana de la protegrina-1 producida en cloroplastos de tabaco contra *Erwinia carotovora* y contra el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) que corresponden a patógenos de plantas.

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana de las protegrinas.

Microorganismo	Gpo	Enfermedad	Protegrina MIC/IC50(µg/mL)	Referencia
<i>Streptococcus sp.</i>	G +	Artritis y mucosistis	0.25-4 IB367	Chen y col., 2000.
<i>Corynebacterium sp.</i>	G +	Difteria y bacteriemia	0.13-0.25 IB367	Chen y col., 2000.
<i>Staphylococcus sp.</i>	G +	SOC toxico, artritis, meningitis	0.13-4 IB367 1.7 PG1	Chen y col., 2000. Steinberg y col., 1997
<i>Moraxella sp.</i>	G -	Infec. respiratorias	0.2-0.8 IB367	Chen y col., 2000.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Asociada a mucosistis	2.7 PG1	Steinberg y col., 1997

<i>Streptococcus mitis</i>	G +	Asociada a mucosistis	2-43	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus salivarius</i>	G +	Asociada a mucosistis	0.2-5	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus sanguis</i>	G +	Asociada a mucosistis	4-64	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus mutans</i>	G +	Asociada a mucosistis	0.7-1.3	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Asociada a mucosistis	2.7	PG1	Steinberg y col., 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	G +	Listeriosis	>10	PG1	Turner y col., 1998
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	G -	Gonorrea	8 0.3-10	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Shafer y col., 1998
<i>Serratia marcescens</i>	G -	Asociada a mucosistis	16-256	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Haemophilus sp.</i>	G -	Septicemias y neumonía	1-8 0.5-5	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Fortney y col., 1998
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	Infec. Urinarias y neumonía	1-5	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	Asociada fibrosis quística	1-8 0.5	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Albrecht y col. 2002.
<i>Burkholderia cepacia</i>	G -	Asociada fibrosis quística	6-10	PG1	Albrecht y col. 2002.
<i>Escherichia coli</i>	G -	Diarreas y septicemia	0.25-1	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M	Tuberculosis	50	PG1	Miyakawa y col., 1996.
<i>Leptospira interrogans</i>	E	Leptosporiosis	4.3-215	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Borrelia sp.</i>	E	Enfermedad de Lyme	215.6	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Treponema pallidum</i>	E	Sífilis	32.3	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Candida albicans</i>	L	Candidosis	4-16 4-16	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Yoon y col., 1998.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	P	Clamidiosis	1.76-2.4 6	IB367 PG1	Yasin y col. 1996
<i>Trypanosoma brucei</i>	P	Enfermedad del sueño	107	PG1	Mc Gwire y col., 2003.
VIH	V	SIDA	10-50	PG1	Tammamura y col., 1995; Seinestraesser y col., 2005.

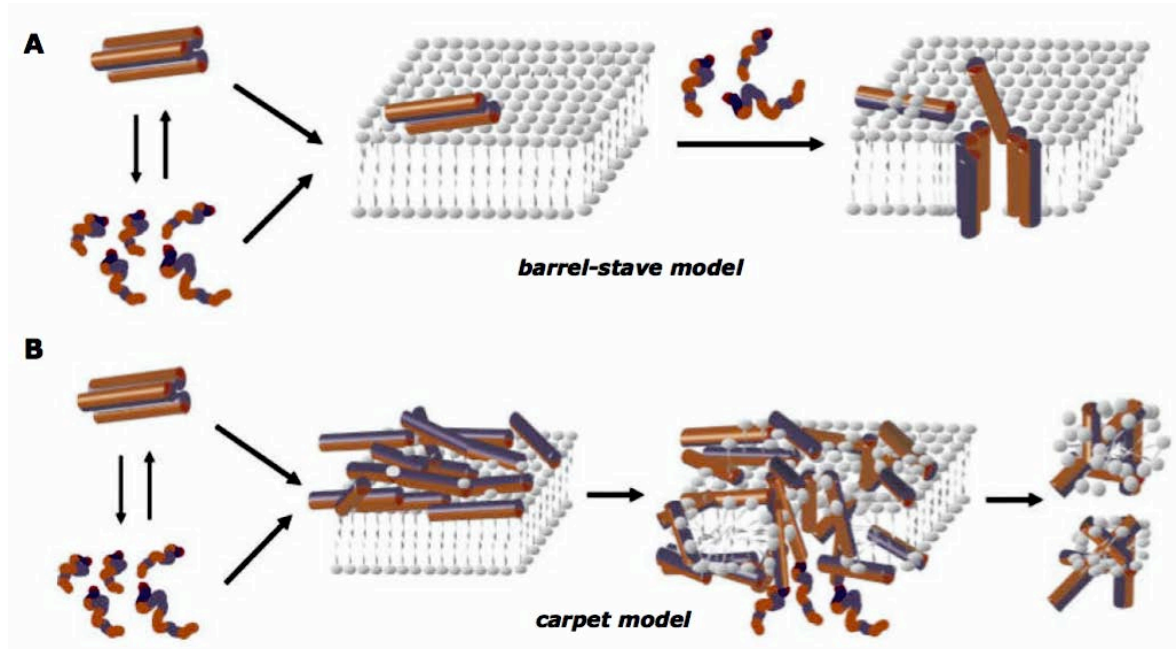
G +: Bacterias Gram positivas; G -: Bacterias Gram negativas; E: espiroquetas; L: levaduras; M: micobacterias; P: protozoarios; V: virus; VIH; virus de inmunodeficiencia humana; SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida; MIC: Concentración Mínima Inhibitoria; IC50: Concentración Inhibitoria del 50%. PG1; Protegrina-1. IB367; Análogo de la protegrina-1.

#### 1.4 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

El primer paso de la interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo se lleva a cabo por atracción electrostática. El segundo paso es la permeabilización de la membrana. Existen dos mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos; uno es conocido como el modelo de barril, que se da por la formación de poros en la membrana debido a la incorporación de los péptidos y su organización en poros; el segundo modelo es el modelo de carpeta, que se da por la agregación continua



de péptidos en la membrana bacteriana y posteriormente la ruptura de la membrana al promoverse el paso de péptidos al interior de la célula en un proceso autocatalítico (Fig. 3). Al final se lisa la célula como consecuencia de un choque osmótico (Ogata y col., 1992; Boman, 1995).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos: A) Modelo de barril, B) Modelo de alfombra. Tomada de Shai (2002).

La actividad antimicrobiana de las protegrinas fue caracterizada en experimentos *in vitro* con péptidos purificados. Los péptidos antimicrobianos, específicamente las protegrinas, tienen un amplio espectro de acción microbiana en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra virus con cubierta lipídica y hongos. Las concentraciones mínimas inhibitorias se encuentran en un rango de 0.1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Starner y col., 2005). Se ha observado que la resistencia bacteriana a los péptidos antimicrobianos es un fenómeno bastante raro, no obstante puede tener lugar por la inactivación del péptido, la incapacidad del péptido para llegar a la diana bacteriana, modificación de la diana bacteriana, o el uso de mecanismos de captación-expulsión por la bacteria. De forma general involucran la modificación de la capa externa de la pared celular como los lipopolisacáridos, ácido teicoico, y fosfocolina (López-Brea, 1999; Bruno y col., 2006). Además del papel de antibióticos endógenos, los péptidos antimicrobianos tienen otras

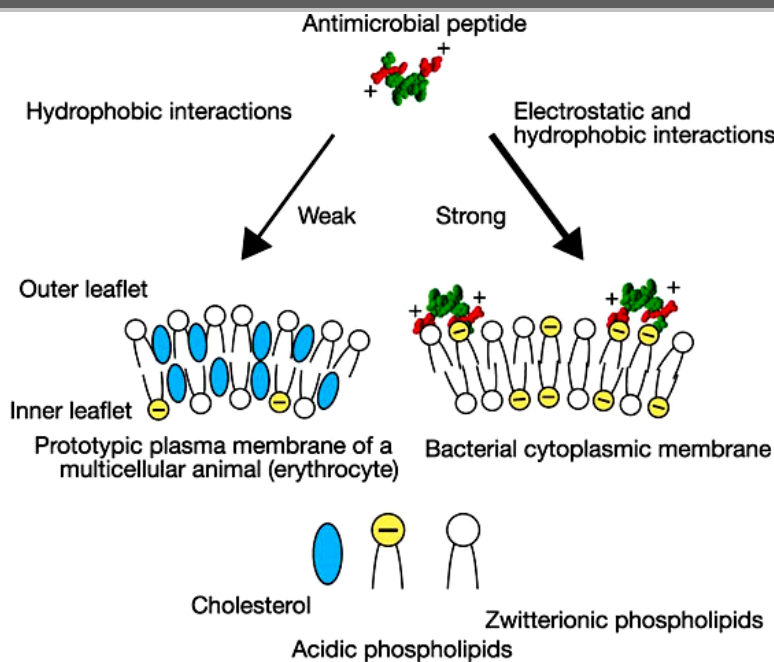
---

funciones que favorecen la inflamación, la cicatrización y la regulación de la respuesta inmune (Zasloff, 2002).

Hoy se sabe que los péptidos antimicrobianos no sólo producen la permeabilización de las membranas bacterianas, sino que poseen otras funciones como la inhibición de la síntesis de proteínas del ADN de la bacteria al unirse a los ribosomas, actividad antitumoral, la estimulación de la proliferación celular y la angiogénesis (Kamysz y col., 2003).

#### **1.4.1 Especificidad de los péptidos antimicrobianos**

El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es un mecanismo general que se basa principalmente en la atracción electrostática del péptido catiónico con la membrana aniónica del microorganismo; el mecanismo de acción es concentración-dependiente, por lo que la especificidad de los péptidos antimicrobianos está dada primordialmente por las diferencias que existen entre las membranas de procariotes y eucariotes. Por ejemplo, la presencia de colesterol en las membranas de eucariotes le provee mayor estabilidad a la estructura de la membrana y reduce significativamente la actividad antimicrobiana, además de que la composición de los lípidos de la membrana externa de las células de eucariotes es en gran parte de carácter catiónico, mientras que los lípidos con alta carga eléctrica negativa solo se encuentran en la cara interna de la membrana, por lo tanto la atracción electrostática entre la membrana y el péptido antimicrobiano es menor (Zasloff, 2002). Los péptidos antimicrobianos como la protegrina producen daño particularmente en la membrana microbiana (por los lipopolisacáridos en bacterias y los mananos/glucanos en levaduras) pues tienen mayor afinidad por ésta, debido a la mayor cantidad de fosfolípidos con carga neta negativa en la membrana externa (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la especificidad de los péptidos antimicrobianos. Tomada de Zasloff, (2002).

### 1.5 Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos

El potencial terapéutico de los péptidos antimicrobianos en enfermedades infecciosas es muy amplio. En pacientes con quemaduras graves se ha demostrado la pérdida de la capacidad de producción de defensinas en la piel afectada, por lo que en estos pacientes las infecciones recurrentes son muy comunes, y en ocasiones, se convierten en complicaciones mortales. Se ha observado que la aplicación de defensinas por vía tópica en estos pacientes disminuye hasta en un 90% las infecciones recurrentes, además de que la aplicación de los péptidos antimicrobianos induce una mejor cicatrización debido a que algunos péptidos antimicrobianos como las protegrinas, en especial la LL-37, estimulan la proliferación de las células epiteliales, además de su efecto antimicrobiano (Milner y col., 2002). De igual forma se ha encontrado que las protegrinas y las defensinas son eficaces en contra de *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium tuberculosis* (Bruno y col., 2006).

El amplio espectro de acción de los péptidos y la baja incidencia de resistencia bacteriana a los mismos, los sitúan como candidatos importantes para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Su baja toxicidad, así como la posibilidad de una administración tópica o sistémica, les dan una ventaja sobre otros antibióticos (Bruno y col., 2006). Actualmente

---

se han producido con gran éxito, péptidos como los lantibióticos usados para la conservación de alimentos, que se han expresado tanto en bacterias como en hongos (Sahl y Bierbaum, 1998), y en bacterias es necesario introducir el gen de inmunidad para evitar afectar el crecimiento de la cepa receptora del transgén.

## **1.6 Uso de la agrobiotecnología para la expresión de proteínas recombinantes en plantas**

La producción heteróloga de proteínas en plantas ofrece ventajas con respecto a otros sistemas: (1) bajos costos de producción en comparación con biorreactores, o animales transgénicos, (2) la purificación de la proteína heteróloga es económica y en ocasiones no es necesaria, (3) se evitan contaminaciones por toxinas o secuencias virales, que pueden tener otros sistemas (Giddings, 2001). La principal ventaja de las plantas como sistemas de producción es la disponibilidad casi ilimitada de biomasa que puede obtenerse utilizando la infraestructura ya existente para la siembra, cosecha, almacenamiento y procesamiento de cultivos. El capital de inversión inicial y el costo para el aumento en la escala de producción son relativamente bajos. De tal manera que en el presente trabajo proponemos el uso de las plantas como biorreactores para producir proteínas o péptidos de interés terapéutico.

## **1.7 Métodos de producción de proteínas recombinantes en plantas**

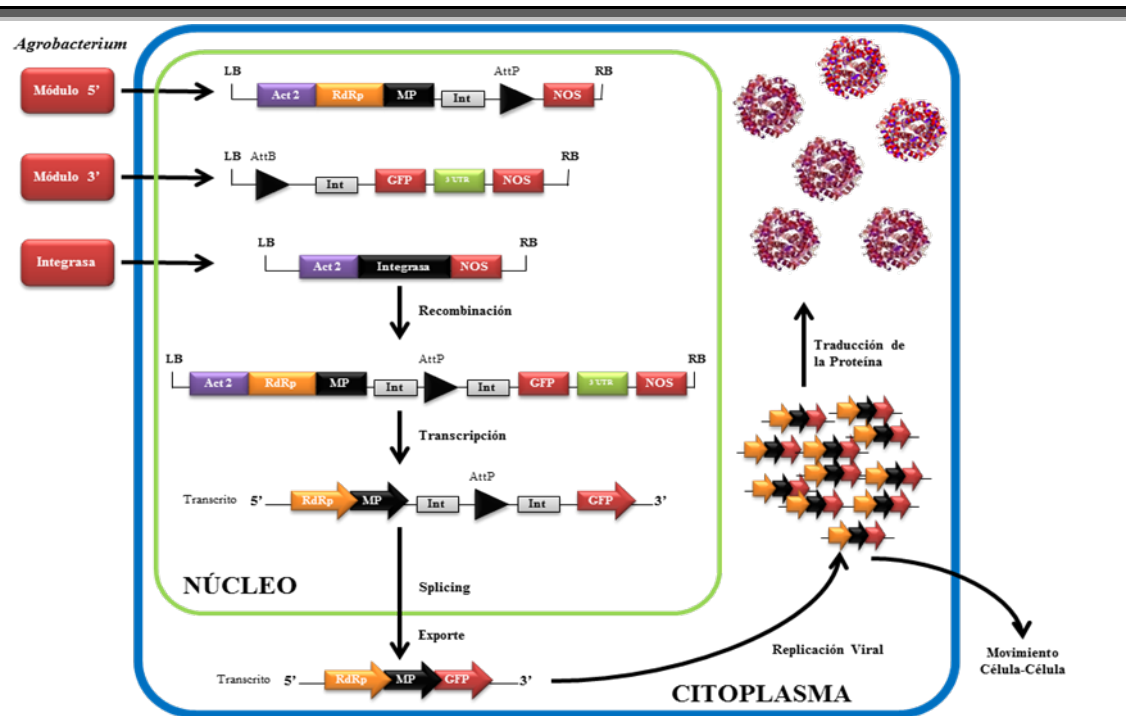
La manipulación genética de plantas ha sido posible desde hace más de 20 años, cuando se logró por vez primera introducir genes foráneos al genoma de las plantas por el grupo del doctor Montagu (Herrera-Estrella y col., 1983). En este sentido se ha avanzado grandemente en la transformación genética de plantas, con el fin de expresar proteínas de interés industrial, terapéutico o comercial. En el presente trabajo nos enfocamos en revisar los aspectos relacionados con la transformación transitoria usando virus desarmados y la transformación de cloroplastos, como modelos de transformación para producir altos niveles de la protegrina-1.

### **1.7.1 Expresión transitoria de proteínas, usando vectores virales desarmados**

---

Existen dos procesos de expresión transitoria que se utilizan habitualmente hoy en día: la expresión de genes realizada por *Agrobacterium* y la expresión usando vectores virales que infectan plantas. En ambos casos la expresión se basa en la entrega de los transgenes por un vector (bacteria o virus), y no existe la necesidad de que la inserción de los transgenes se lleve a cabo de una forma estable (Fischer, y col., 2004). Una ventaja de estos sistemas es la velocidad en la que se puede obtener la proteína recombinante, aproximadamente de 3-4 días necesarios para la plena expresión en las hojas infiltradas por *Agrobacterium*, y aproximadamente de 10-14 días para la expresión máxima de vectores virales.

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido mejorar el sistema de expresión usando virus desarmados, creando una nueva tecnología llamada magnICON<sup>®</sup> (protocolo comúnmente conocido como “Magniffection”), la cual permite la amplificación transitoria de genes a partir de vectores virales que son introducidos a la planta vía *Agrobacterium*. Esta moderna tecnología desarrollada por el grupo del Dr. Marillonet en Icon Genetics, Alemania, empresa que posteriormente fue comprada por Bayer Crop Sciences (Álvarez y Cardineau, 2010), presenta diversas características que la hacen ser un protocolo excelente para producir proteínas recombinantes en plantas en corto tiempo. Estos vectores virales están divididos en varios módulos: el módulo 3' es donde se inserta la secuencia genética a expresarse (gen de interés), el módulo 5' que contiene a la replicasa viral así como el péptido señal que puede dirigir a la proteína hacia algún sitio específico dentro de la célula vegetal; y por último un vector que contiene una integrasa, cuya función es unir a los dos módulos anteriores mediante un proceso de recombinación *in vivo* (Gleba, 2005) (Fig. 5).



**Figura 5.** Representación esquemática de la tecnología de expresión transitoria llamada “Magnifection”. LB y RB, borde derecho e izquierdo del vector binario respectivamente; Int, intrón; AttB y AttP, elementos de recombinación específicos de ADN; UTR, región no traducible; NOS, terminador de la nopalina sintasa; Act2, promotor del gen 2 de actina de *Arabidopsis*; MP, proteína de movimiento del virus; RdRP, gen de la replicasa dependiente de ARN; GFP, proteína verde fluorescente.

La técnica consiste en infectar a la planta con una suspensión diluida de *Agrobacterium* (la cual contiene cada uno de los tres módulos descritos anteriormente) aplicando presión por medio de vacío, o inoculando directamente con la ayuda de una jeringa sobre el tejido foliar de la planta; después de 2-3 semanas la biomasa se recolecta y se realiza la extracción de la proteína recombinante, que puede llegar a alcanzar niveles de expresión de hasta un 40% de la proteína soluble total (PST). Esta tecnología ecléctica combina las ventajas de tres sistemas biológicos: la rapidez de infección y los niveles de expresión de un virus, la eficiencia de transfección de *Agrobacterium* y las capacidades pos-traduccionales y bajos costos de producción de las plantas. Hasta la fecha se han expresado más de 50 proteínas usando esta tecnología, la cual ha mostrado altos niveles de expresión y las proteínas generadas han sido biológicamente activas (Marillonet y col., 2004).

### 1.7.2 Transformación de cloroplastos por el método de biobalística

El cloroplasto es responsable de la fotosíntesis, la producción de un gran número de productos y la síntesis de una gran variedad de moléculas

---

requeridas para las funciones básicas y la arquitectura de la célula vegetal (Buchanan y col., 2000). El cloroplasto, al igual que la mitocondria, es un organelo semi-autónomo y contiene la maquinaria genética requerida para la síntesis de sus propias proteínas, lo que le da a su genoma características particulares muy distintas a las del genoma nuclear. El genoma de cloroplasto puede existir hasta en 100 copias por organelo, y cada célula del mesófilo puede contener hasta 50 cloroplastos, por lo cual una célula puede portar de 1,000 a 5,000 copias del genoma plastídico (Maliga, 2003). Consecuentemente, la expresión de las múltiples copias de los genes del cloroplasto produce una notable abundancia de transcritos y una alta acumulación de proteínas en el organelo (Mc Bride y col., 1995), que puede alcanzar hasta el 46% de la proteína soluble total (De Cosa y col., 2001). A diferencia del núcleo, la expresión génica en el cloroplasto no está estrictamente regulada, y además, no se han descrito fenómenos de silenciamiento de genes localizados en el organelo (Sidorov y col., 1999).

El ADN del cloroplasto (cpADN) tiene forma circular, está constituido por una doble hebra superenrollada y no existen proteínas con funciones de compactación, como es el caso de las histonas de los cromosomas nucleares. El cpADN es una molécula de tamaño variable, desde 120 kb hasta 220 kb (Palmer, 1985). La organización de los genes en el cloroplasto es de una forma particular, ya que contiene los genes para producir cada uno de los rARN de los ribosomas típicos del cloroplasto (16S, 23S, 4.5S y 5S) (Harris y col., 1994). También contiene genes para los tARN y genes que codifican algunas proteínas requeridas en los procesos de transcripción y traducción dentro del cloroplasto o requeridas para la fotosíntesis (Buchanan y col., 2000).

El genoma del cloroplasto contiene dos copias de cada uno de los genes para la producción de ARN de transferencia denominados tARN. Los genes de tARN se localizan en dos regiones del genoma de cloroplasto (cpADN) de 10 a 25 kb, con secuencias repetidas idénticas pero con orientación invertida que se conocen como LIR y RIR (Maliga y col., 2005). Esta característica ha sido aprovechada para el diseño de vectores que insertan los genes sintéticos en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga, con la finalidad de expresar una proteína recombinante.

---

Hasta el momento se han logrado secuenciar 82 genomas de cloroplastos de diversas especies vegetales y algas, lo que abre una amplia ventana de estudio sobre la expresión de proteínas heterólogas en diversas especies, usando como modelo de expresión el genoma de cloroplasto (Cui y col., 2006).

En general, la transformación de cloroplastos para la expresión de proteínas de interés terapéutico se presenta como una alternativa importante para mejorar la producción de proteínas recombinantes (Sytnik y col., 2005). La técnica involucra la inserción de genes foráneos flanqueados por secuencias homólogas del genoma de cloroplasto, que facilita la doble recombinación y la inserción sitio específica del ADN foráneo en el genoma de cloroplasto.



---

## **II. OBJETIVOS**

---

## II. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo general

Expresar la protegrina-1 de origen porcino en tejidos vegetales usando el sistema de expresión transitoria "Magnifection" y en cloroplastos de tabaco transformados por biobalística.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Generar las construcciones genéticas para la transformación transitoria de tabaco por la técnica de "Magnifection".
2. Transformar tabacos por el método de "Magnifection".
3. Determinar la expresión transitoria de la protegrina por ensayos de RT-PCR.
4. Demostrar si la protegrina producida en tabaco es biológicamente activa contra patógenos de humano.
5. Generar las construcciones genéticas para la transformación de cloroplastos de tabaco.
6. Obtener tabacos transplastómicos que expresen la protegrina-1.
7. Determinar la integración del transgén al genoma del cloroplasto por ensayos de PCR y de Southern blot.
8. Determinar la expresión del transgén por ensayos de RT-PCR.
9. Analizar la producción de la proteína recombinante por ensayos de Western blot.
10. Determinar la actividad antimicrobiana de la protegrina producida en cloroplastos de tabaco, con patógenos de humanos y plantas.

---

# **III. JUSTIFICACIÓN**

---

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas son las primeras causas de muerte a escala mundial al final del milenio, según lo reportado por la WHO (2004). Actualmente existen bacterias resistentes a un amplio número de antibióticos. Una alternativa importante para combatir las enfermedades infecciosas son los péptidos antimicrobianos, dentro de los cuales las protegrinas se presentan como una interesante alternativa para combatir dichas enfermedades. Las protegrinas (PG) son péptidos de la familia de las catelicidinas, ricos en arginina y cisteína. Las protegrinas conservan su actividad en presencia de NaCl a concentraciones fisiológicas, así como en presencia de cationes divalentes. Además conservan su actividad en un amplio rango de pH (4.5-7.5), a diferencia de las defensinas de humanos y conejos donde el pH óptimo es entre 6.5 y 7.5, las protegrinas son activas inclusive a pH 4.5 contra bacterias ácido tolerantes Gram-negativas o levaduras. De igual forma, las protegrinas naturales son activas a concentraciones micromolares. Por tal motivo, es importante establecer sistemas económicos para su producción, como lo son la expresión de proteínas en plantas, ya sea de manera transitoria mediante vectores virales o de manera estable en cloroplastos por su alto número de copias. La manipulación genética de plantas ha sido posible desde hace varias décadas, cuando el grupo del Dr. Montagu logró por vez primera introducir genes foráneos al genoma de las plantas (Herrera-Estrella y col., 1983). La producción heteróloga de proteínas en plantas ofrece ventajas con respecto a otros sistemas como: bajo costo de producción en comparación con biorreactores o animales transgénicos; la purificación de la proteína heteróloga es económica y a veces no es necesaria; se evita contaminación por toxinas o secuencias virales que pueden tener otros sistemas (Giddings, 2001). El tabaco como modelo de expresión, permite obtener plantas transgénicas en tiempos cortos. Con base en lo anterior, en el presente trabajo nos enfocamos a expresar la protegrina-1 de origen porcino por dos sistemas de expresión; la expresión transitoria por el método de "Magniffection" y la transformación del genoma de cloroplasto de tabaco.

---

# **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Esterilización y germinación de semillas

En los dos sistemas vegetales utilizados se empleó un método general para desinfectar las semillas. Se contaron las semillas que se deseaban germinar y se colocaron envueltas en paquetes de gasa, cerrándolas, posteriormente en la campana de flujo laminar se esterilizaron siguiendo los pasos que a continuación se describen: Se colocan los paquetes de gasa en un vaso de precipitado estéril con alcohol al 70% durante 10 min y se enjuagaron las semillas con agua desionizada estéril tres veces en lapsos de 2-3 min cada lavado; se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial con 6% de ingrediente activo al 50%) (v/v) más 5 gotas de tween 20 (surfactante) y 15 gotas de microdin<sup>®</sup> (solución de plata coloidal), por 15 min con agitación; se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, cada enjuague de 4 a 5 min, y finalmente las semillas se pusieron a germinar en medio MS.

### 4.2 Métodos de transformación en plantas

#### 4.2.1 Ensayos de transformación transitoria con vectores virales por medio de *Agrobacterium tumefaciens*

##### 4.2.1.1 Ensayos de “Magniffection”

Para los ensayos de “Magniffection” se utilizó el protocolo reportado por Marillonet y col., en el 2003. Se utilizó la cepa de agrobacteria sugerida por los autores: *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Los vectores virales contenidos en los tres diferente módulos independientes se introdujeron por separado en *Agrobacterium* por el método de electroporación y posteriormente la bacteria se creció en 5 mL de medio LB a 28 °C con agitación constante y con el antibiótico adecuado (Carbenicilina 50 µg/L). Cuando el cultivo bacteriano alcanzó la OD<sub>625nm</sub> de 1.6-2.5 (aproximadamente en 2 días), las bacterias se recuperaron por centrifugación a 8,000 rpm durante 5 minutos y se le agregaron 10 mL de buffer de infiltración (MES 10mM y MgSO<sub>4</sub> 10mM y con un pH de 5.5) para resuspender la pastilla bacteriana, se lavó por lo menos dos veces con el buffer de infiltración. Finalmente la pastilla bacteriana se resuspendió en 5 mL de buffer de infiltración, para después mezclar las tres bacterias que contenían

---

cada uno de los módulos independientes: módulo 3' (módulo que contiene el gen de interés ya sea la protegrina-1 o GFP), módulo 5' (módulo donde se encuentra la proteína de movimiento y la replicasa dependiente de RNA) y el módulo de la integrasa; y para su uso en la infiltración se les adicionó aproximadamente 1 L de buffer de infiltración.

Se utilizaron plantas de tabaco de aproximadamente 6 semanas de edad, las cuales fueron extraídas de la tierra con todo y raíz y enjuagadas para eliminar el exceso de tierra. Las plantas fueron colocadas con la parte aérea hacia abajo y la raíz hacia arriba en la cámara de infiltración previamente llenada con la suspensión bacteriana. Se aplicó vacío durante aproximadamente 1-1.5 minutos, el vacío se rompió lentamente y las plantas fueron extraídas de la suspensión bacteriana eliminando el exceso con una sanita. Finalmente las plantas infiltradas fueron colocadas nuevamente en tierra para incubarse durante 10 días en condiciones de invernadero.

## **4.2.2 Transformación de cloroplastos de tabaco mediante biobalística**

### **4.2.2.1 Preparación de la suspensión de micropartículas de oro**

Protocolo de Daniel y col. (2005):

Se pesaron 55 mg de partículas de Oro de 0.6  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad) en un tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 mL, se les agregó 1 mL de etanol 100%, se mezclaron por 3 min con vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2-5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 70% (recién preparado) y se mezcló con vórtex de 1-2 min. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min, agitando cada 3 min. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2-5 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de agua estéril y se mezcló con vórtex vigorosamente durante 1 min. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que las partículas se fueran hacia el fondo. Se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron dos veces, para finalmente agregar 950  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50%.

### **4.2.2.2 Preparación de material para el bombardeo**

Se ensamblaron el sujetador del macroacarreador junto al macroacarreador de un equipo de balística Bio-Rad (PDS-1000/He biolistic), se envolvieron en aluminio y se esterilizaron en autoclave. Las mallas de retención

---

fueron esterilizadas en autoclave o por inmersión en etanol al 70% y posteriormente se secaron en ambiente estéril. Los discos de ruptura se sumergieron durante 5 minutos en etanol al 70% y se dejaron secar en ambiente estéril.

#### **4.2.2.3 Cobertura de microacarreadores con ADN**

Se usaron 50  $\mu\text{L}$  de microacarreadores preparados previamente en glicerol 50%. Se mezclaron con vórtex las partículas de oro, hasta que se encontraban completamente resuspendidas. En el siguiente orden se fueron agregando los componentes necesarios para unir el ADN a las micropartículas de oro. Todo el tiempo las partículas se estuvieron mezclando con vórtex durante 5 segundos entre cada componente:

- 1.- Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de ADN (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),
- 2.- 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5M (recién preparado),
- 3.- 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0.1M.

Se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a temperatura ambiente y se aplicó vórtex durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 8,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol durante al menos 4 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% y se conservaron en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 5 bombardeos.

#### **4.2.2.4 Preparación del material biológico**

Se utilizaron hojas provenientes de plantas de tabaco de 6 semanas (var Petit Habana, SR1) crecidas en MS en condiciones de esterilidad. Se escogieron hojas uniformemente verdes y carnosas, y de un tamaño límite de 2.5 cm de largo por 4 cm ancho. Las hojas de tabaco fueron puestas sobre medio RMOP, en cajas de Petri con la cara abaxial hacia arriba para realizar el bombardeo.

#### **4.2.2.5 Bombardeo del material biológico de tabaco**

Se utilizó una pistola Bio-Rad (PDS-1000/He biolistic) con gas Helio para el disparo. La campana de flujo laminar al igual que la pistola se esterilizaron



---

con etanol al 100%, al menos 15 minutos antes de iniciar, así como luz UV por 1 h antes de encender la campana.

A continuación se describe el procedimiento para realizar el bombardeo de tabaco y lechuga, con el objetivo de introducir ADN a los cloroplastos. Se abrió la válvula del tanque de helio y se ajustó la presión del manómetro de salida a 1,400 psi (lb/in<sup>2</sup>). Es importante que la presión de salida sea superior a la resistencia del disco de ruptura. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron los discos de ruptura de 1,100 p.s.i. La suspensión de micropartículas con ADN se depositó en los macroacarreadores a razón de 10 µL por disparo. Se colocó la caja de Petri con la hoja o callo, a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 28 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. Se retiró la placa de Petri con la hoja o callo y se le colocó la tapa. Las hojas bombardeadas se incubaron en medio MS0 durante 48 h a 27 °C en la obscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en piezas de alrededor de 2 mm<sup>2</sup> y las hojas de tabaco se depositaron en medio RMOP con espectinomicina 500 mg/L, para inducir la selección de las plantas transplastómicas. Se utilizaron aproximadamente de 15 a 20 hojas por disparo, y se bombardeó la construcción pKCZ-PG1 bicistrónica generada (Patiño-Rodríguez, 2005).

---

# **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

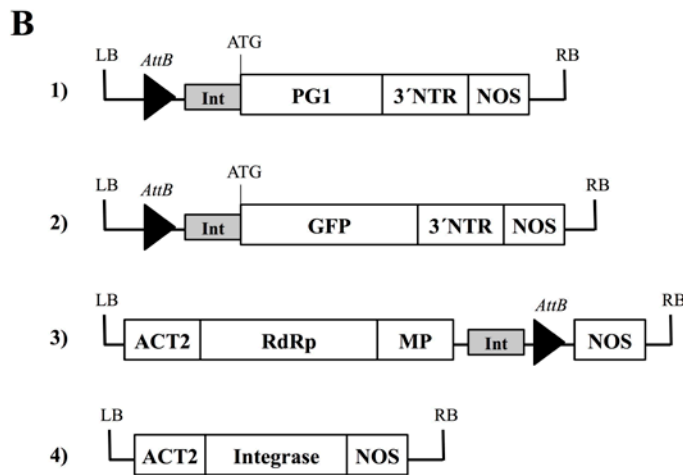
### CAPÍTULO 1

#### EXPRESIÓN DE LA PROTEGRINA-1 POR TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA USANDO VECTORES VIRALES EN TABACO

##### 5.1 Subclonación del gen de interés en vectores virales para la expresión transitoria en hojas de tabaco

Con el fin de poder expresar el gen de la protegrina-1 utilizando la tecnología magnICON, se diseñó un gen de la protegrina-1 para la expresión nuclear con codones de uso preferencial para su expresión en citoplasma, a diferencia de las construcciones de cloroplasto que se diseñaron para un uso preferencial de codones en dicho organelo (ver Capítulo VI). El gen de la protegrina-1 se fusionó en la fase de lectura al péptido señal de la proteína anti-fúngica 2 de rábano (Rs-AFP2), con el fin de dirigir la expresión hacia el espacio intercelular (apoplasto), además de que dicho procesamiento ayuda a la modificación post-traducciona l de la protegrina-1 al favorecer la formación de puentes disulfuro, como lo hace de forma natural la proteína 2 anti-fúngica (AFP2) de rábano (Terras y col., 1995).

La secuencia peptídica de la protegrina-1 se muestra en la Figura 6A.



**Figura 6.** Secuencia de la Protegrina-1 y vectores usados para la transformación transitoria. A) Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la protegrina-1 fusionada traducionalmente al péptido señal de la proteína anti-fúngica 2 de rábano (\*Rs-AFP2), B) Módulos utilizados para la estandarización de la metodología de Magnifection y expresión de la protegrina. 1) Módulo 3', pICHPG1; 2) Módulo 3', pICHGFP; 3) Módulo 5'; 4) Módulo Integrasa. LB y RB, bordes izquierdo y derecho del vector binario; Int, intrón; *AttB* y *AttP*, elementos específicos de recombinación de ADN; NTR, región no traducible; NOS, terminador de la nopalina sintasa; ACT2, promotor del gen 2 de actina; MP, proteína de movimiento.

El gen de la protegrina-1 se flanqueó con los sitios de restricción *NcoI* y *SacI* y se clonó en el vector pICH11599, para finalmente lograr obtener el vector pICHPG1 el cual corresponde al módulo 3' del sistema magnICON, metodología que comúnmente es conocida como "Magnifection". En la Figura 6B se muestran todos los módulos correspondientes al sistema de "Magnifection" que fueron utilizados en este estudio.

Todas las construcciones genéticas se transformaron individualmente en *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) y se almacenaron los stocks en glicerol,

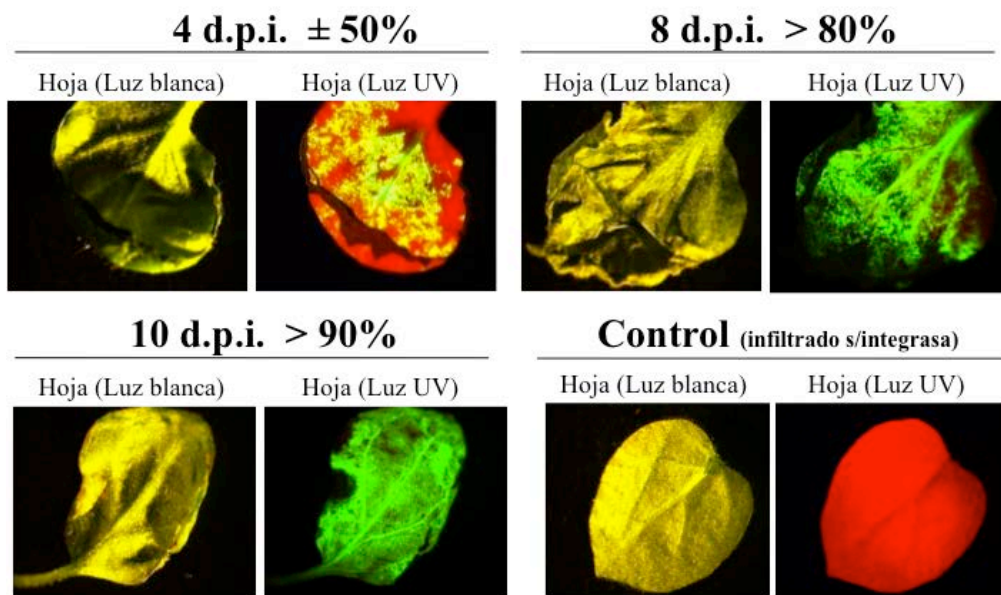
---

a -80°C. Las construcciones tienen elementos que le confieren resistencia a kanamicina y rifampicina. Dos días antes de realizar cada experimento se sembraba un pre-inóculo en medio LB con los dos antibióticos para realizar la infiltración de las hojas de tabaco (4-6 semanas de edad).

## **5.2 Estandarización de la metodología de “Magnifection” con la proteína verde fluorescente (GFP) en *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum***

Con el fin de estandarizar la técnica de “Magnifection” fue necesario demostrar la capacidad de infección de los vectores virales utilizando un gen reportero como la proteína verde fluorescente (GFP). De tal modo que se probaron dos especies de *Nicotiana*: *N. benthamiana* y *N. tabacum*, la primera debido a que existen varios reportes con buenos resultados usando la técnica de Magnifection (Marillonnet y col., 2003; Gleba y col., 2005), y la segunda especie debido a que contamos en el laboratorio con una variedad que posee un bajo contenido de alcaloides (Menassa y col., 2007), lo cual tiene como ventaja el que no se enmascara el posible efecto antimicrobiano de nuestro péptido. No obstante de usar en ambos casos como control las variedades silvestres, y por otro lado, en caso de un posible escalamiento de nuestro sistema para la purificación del péptido, es recomendable no tener alcaloides en el material vegetal.

Para *N. benthamiana*, se utilizaron plantas de aproximadamente 3-5 semanas y se infiltraron en una ocasión durante 60 segundos con la suspensión de *Agrobacterium* con los tres módulos (módulo 3', módulo 5' y módulo integrasa), usando el módulo 3' que tiene el gen reportero (pICHGFP). Se evaluaron los resultados de la infección a los 4, 8 y 10 días post infección (d.p.i), los resultados de la expresión de GFP de los tabacos infectados se muestran en la Figura 7.

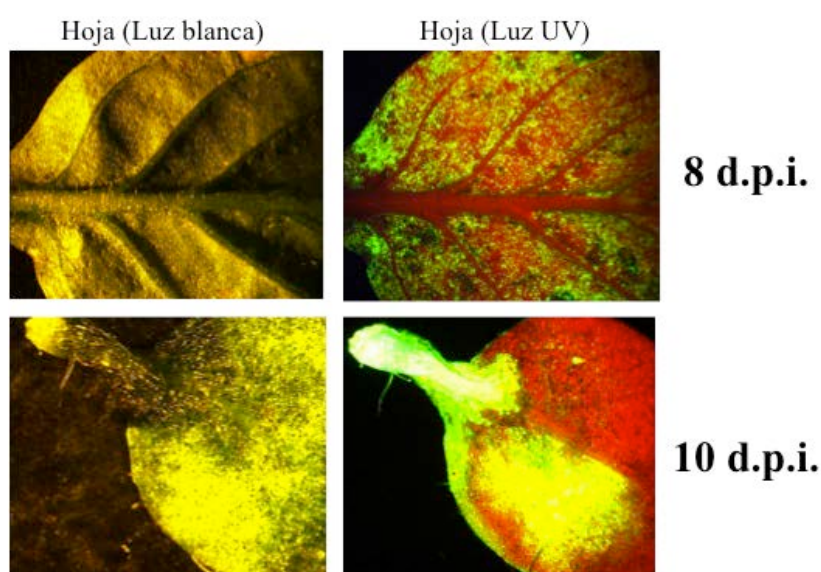


**Figura 7.** Expresión de GFP por la metodología de “Magniffection” usando como módulo 3’ el vector pICHGFP en *Nicotiana benthamiana*.

Las fotos se tomaron en dos sesiones, la primera bajo la luz blanca y la segunda bajo la luz UV, las fotos de la luz blanca se utilizaron como un control de fondo. Como podemos ver en la Figura 7, a los 4 d.p.i aproximadamente el 50% de la hoja está produciendo la proteína verde fluorescente, y conforme avanza el tiempo se puede detectar con mayor intensidad la producción de GFP, por ejemplo a los 8 d.p.i se logra observar la expresión de GFP en el 80% de la hoja, y a los 10 d.p.i en más del 90% de la superficie foliar. Cabe mencionar que en las hojas infiltradas solamente con los módulos 3’ y 5’, sin el módulo de la integrasa, se observa claramente bajo la luz UV la fluorescencia característica de la clorofila, de un rojo intenso (Control). Una observación interesante que es más clara en las fotos bajo la luz blanca, es que las hojas infiltradas muestran evidentes signos de virosis, como enchinamiento y amarillamiento de la hoja, lo cual era esperado, llegando incluso a dañar tanto a la planta que a los 15 d.p.i ésta podía morir por la excesiva carga viral o bien por la producción elevada de la proteína recombinante (Marillonnet y col., 2004). El probar un gen reportero es importante, ya que nos puede dar una idea del tiempo en el cual uno debe cosechar su material con su proteína recombinante. Se ha visto que dependiendo del vector viral, tipo de bomba de vacío o cámaras de infiltración, los tiempos de cosecha pueden variar de 3 a 10 días.

---

La variedad de *N. tabacum* utilizada en este estudio fue donada por la Dra. Menassa (Menassa y col., 2007) ya que es una variedad de tabaco que produce un bajo nivel de alcaloides y fue usada por su grupo de investigación para producir una proteína antigénica. Para adaptar la metodología de Magniffection con la especie de *N. tabacum*, se utilizaron plantas de aproximadamente 4-6 semanas y se infiltraron en una ocasión durante 45-60 segundos con la suspensión de *Agrobacterium* con los tres módulos (módulo 3', módulo 5' y módulo integrasa), usando el módulo 3' que tiene el gen reportero (pICHGFP). Se evaluaron los resultados de la infección a los 8 y 10 días post infección (d.p.i), y los resultados se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Expresión de GFP por la metodología de “Magniffection” usando como módulo 3’ el vector pICHGFP en *Nicotiana tabacum* variedad que produce bajo nivel de alcaloides.

Como podemos observar en la Figura 8, al infiltrar la variedad de *N. tabacum* a los 8 dpi se observa una importante producción de la proteína GFP, lo cual aumenta conforme pasa el tiempo ya que es posible observar mayor cantidad de proteína recombinante a los 10 dpi. Una característica importante en las infecciones con esta especie vegetal, fue que las plantas no mostraban signos severos de virosis, solo leves síntomas de enchinamiento y las plantas eran capaces de sobrevivir mayor tiempo en comparación con la especie *N. benthamiana*. Por esta razón, se decidió utilizar la variedad de *N. tabacum* que produce bajos niveles de alcaloides, para la producción de protegrina-1, ya que su vida media al ser infectada suele ser mayor, además el hecho de que produzca bajos niveles de alcaloides hace factible usar el extracto crudo en las

---

pruebas antimicrobianas, eliminando la incertidumbre de si el efecto observado es debido a la presencia de alcaloides.

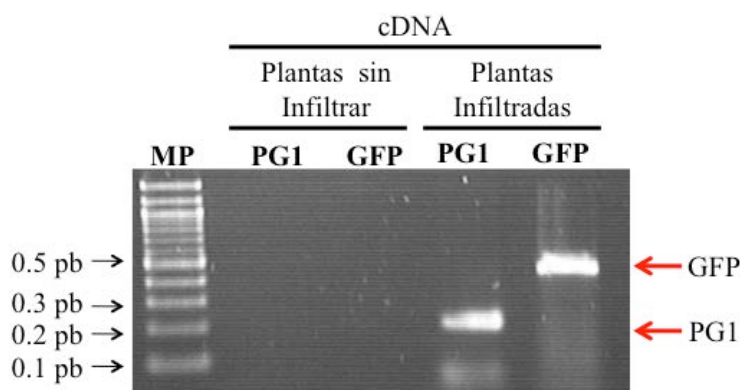
### **5.3 Expresión transitoria de la protegrina-1 con la metodología de “Magnifection” en *Nicotiana tabacum***

Una vez estandarizada la técnica de “Magnifection” decidimos realizar la misma metodología pero utilizando el módulo 3' que corresponde al pIHPG1 que tiene codificado el gen de la protegrina-1. Se utilizaron plantas de tabaco de 4-6 semanas de edad y se infiltraron con la suspensión de *Agrobacterium* en una ocasión, durante 45-60 segundos. Se incubaron durante 10 días en condiciones de invernadero, para posteriormente recolectar todas las hojas de la planta, las cuales fueron congeladas y liofilizadas durante 24 horas. Tras el proceso de liofilización las hojas de tabaco fueron molidas y mezcladas para favorecer la homogeneidad de la proteína heteróloga presente. Cada “lote” proviene de un evento de infiltración, por lo tanto a cada evento de infiltración se le considera como un lote diferente. Este tejido liofilizado se utilizó para extraer proteína soluble total, con la cual se realizaron los ensayos de actividad. Solo para extraer ARN se utilizó tejido fresco sin liofilizar. Los ensayos moleculares de identificación del replicón viral activo, así como los ensayos de actividad biológica se describen en los siguientes apartados.

#### **5.3.1 Detección del replicón viral por RT-PCR en los tabacos infiltrados**

Uno de los ensayos más comúnmente utilizados para identificar a ARNs de cualquier tipo, es el ensayo de RT-PCR ya que permite amplificar a partir de ARN un gen en particular con oligonucleótidos específicos, por lo tanto decidimos utilizar este ensayo para identificar el replicón viral activo. Cabe destacar que el ensayo de identificación del replicón viral activo en forma de ARN es de vital importancia para corroborar la presencia del replicón del virus en el citoplasma. Tras los 10 días del periodo de incubación después de infiltrar, se recolectaron hojas frescas para realizar el proceso de extracción de ARN con el fin de realizar los ensayos de RT-PCR. En la Figura 9 se muestran los resultados del análisis de RT-PCR.





**Figura 9.** Ensayos de RT-PCR de los tabacos infiltrados. Se usaron oligonucleótidos que amplifican el gen de la protegrina-1 (PG1N-F y PG1N-R) y se espera un amplicón de 295 pb, mientras que para los oligos que amplifican el gen de GFP (GFP-F y GFP-R) se espera un amplicón de 500 pb.

Se realizaron ensayos de RT-PCR para identificar el gen de la protegrina así como para el gen de GFP, en los cuales se usó como control negativo el ARN de plantas de tabaco sin infiltrar. En el ensayo de RT-PCR se logró amplificar un fragmento de 295 pb a partir del ARN de las plantas infiltradas con el módulo correspondiente a la protegrina, mientras que para los tabacos infiltrados con el módulo de GFP se logró amplificar un fragmento de 500 pb. Ambos fragmentos fueron del tamaño esperado correspondientes a la presencia de los replicones virales de ARN tanto para la protegrina como para el GFP. Por el contrario, como era de esperarse, no se logró amplificar a partir del ARN de plantas sin infiltrar el genoma viral.

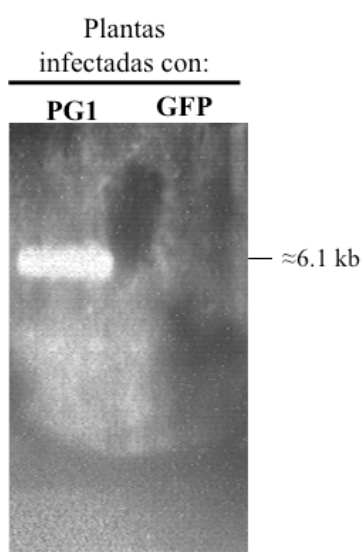
Estos resultados demuestran la capacidad de la tecnología de Magnifection de formar replicones virales de ARN activos a partir de la recombinación de módulos independientes de ADN introducidos a las células de *Nicotiana* por medio de *Agrobacterium*. El ensayo de RT-PCR confirma el ensamblaje del módulo 3' (pICHPG1) con el módulo que cuenta con promotor, de tal modo que un ensayo de RT-PCR positivo indica que se logró formar el replicón viral activo, y por lo tanto se pudo identificar el RNA correspondiente al virus. Además, este resultado se confirmó por un ensayo de Northern blot para verificar la formación del replicón viral activo.

### 5.3.2 Análisis por Northern blot de los tabacos infiltrados

Mediante este ensayo de Northern blot se corroboró la formación del replicón viral activo detectado por RT-PCR. Para esto se utilizó como sonda

---

específica para el gen de la protegrina-1, el amplicón generado con los oligonucleótidos PG1N-F y PG1N-R, mediante el marcaje con el kit Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II. El ARN fue extraído de tejido vegetal fresco de los tabacos infiltrados con 10 días de incubación. Posteriormente el ARN fue cuantificado y se corrió en un gel desnaturalizantes, y el resto del protocolo que corresponde a la hibridación y detección inmunológica de la sonda, se realizó de la misma forma que el Southern blot descrito en el apartado de materiales y métodos. El resultado del ensayo de Northern blot se muestra en la Figura 10.

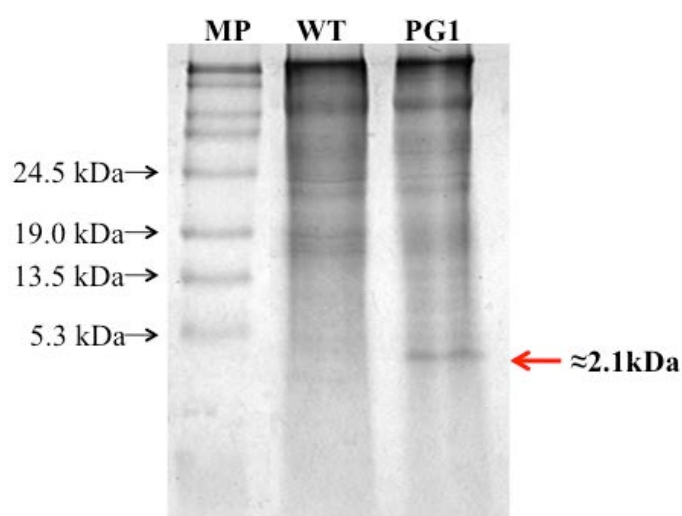


**Figura 10.** Detección del replicón viral de ARN por Northern blot. Se aisló ARN de plantas infiltradas ya sea con el módulo de protegrina (PG1) o con el módulo de la proteína verde fluorescente (GFP) y se analizó por Northern blot usando una sonda específica para detectar la protegrina-1.

Como se observa en la Figura 10, utilizando una sonda específica para protegrina1, en el ensayo de Northern blot se detectó una banda de aproximadamente 6.1 kb, correspondiente al tamaño esperado del replicón viral de ARN y confirma la formación del mismo usando la metodología de Magniffection en las plantas que fueron infiltradas con el módulo de la protegrina1. Por el contrario no se observó señal en el carril control en donde se utilizó ARN de plantas infiltradas con el módulo de GFP. Una vez demostrado la formación del replicón viral de ARN procedimos a comprobar la presencia de la proteína heteróloga mediante análisis de SDS-PAGE y ensayos de actividad biológica.

### 5.3.3 Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados

Se realizó un análisis SDS-PAGE a los extractos proteicos obtenidos del tejido de tabaco infiltrado y previamente liofilizado, con el fin de identificar alguna banda diferencial del peso molecular de la protegrina-1 (2.1 kDa) que pudiera ser un indicio de la presencia del péptido en el extracto proteico. Se realizó el gel de SDS-PAGE al 18% y la electroforesis se dejó corriendo por un tiempo aproximado de 2.5-3 horas. El gel fue teñido con el colorante azul de Coomasie y se tomaron fotografías del gel para poder observar el patrón de bandas. El resultado se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Análisis de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados con el módulo 3' con la protegrina-1. WT; extracto proteico de la línea silvestre, PG1; extracto proteico del tabaco infiltrado con el gen de la protegrina-1. MP, marcador de peso molecular de proteínas.

Como podemos observar en la Figura 11, se puede distinguir en el carril correspondiente a PG1 una banda diferencial de aproximadamente 2.1 kDa que no es posible observar en el carril donde se cargó el extracto proteico de la línea silvestre (WT), lo que sugiere que pertenece a la protegrina-1. Estos resultados solo sugieren la presencia de la protegrina en los extractos proteicos de los tabacos infiltrados con el gen de la protegrina-1. El ensayo por excelencia para confirmar la presencia de un péptido es el análisis por Western blot, sin embargo, hasta hace poco no existía disponible un anticuerpo anti-protegrina en el mercado, por lo que no fue posible realizar este ensayo (Seung-Bum y col., 2010). Por tal motivo, procedimos a realizar una estrategia

---

alternativa para confirmar indirectamente la presencia de la protegrina con base en su actividad biológica de inhibir el crecimiento de microorganismos.

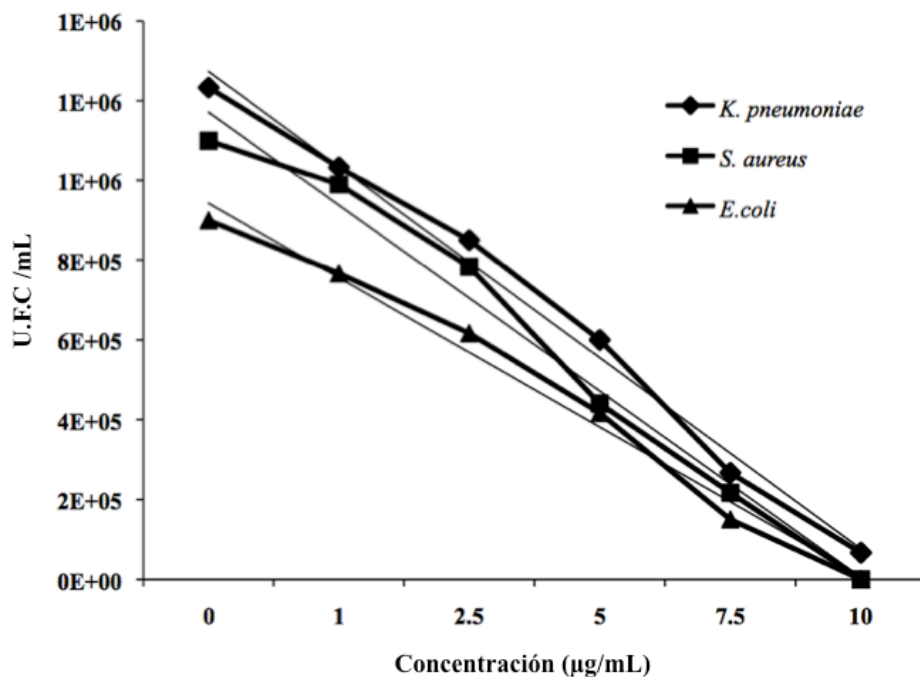
#### **5.3.4 Análisis antimicrobianos de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados y estimación de la concentración de la protegrina-1 producida**

Con el fin de corroborar la producción de protegrina en los tabacos transformados, se decidió medir la actividad antimicrobiana de sus extractos proteicos y compararla contra una protegrina pura.

Con el propósito de estimar indirectamente la concentración de protegrina en nuestros extractos, realizamos una curva dosis-respuesta (concentración-actividad antimicrobiana) con la protegrina pura y la tomamos de referencia para compararla con la actividad antimicrobiana de nuestros extractos proteicos e inferir la concentración de protegrina producida en tabacos por el sistema Magniffection. Para esto se analizó el efecto de diferentes concentraciones de protegrina (0-10  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre el crecimiento de tres diferentes cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* (Figura 12). Como se observa en la Figura, existe una correlación positiva entre la concentración de protegrina pura y el incremento de la actividad antimicrobiana, alcanzando una inhibición casi completa a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Los coeficientes de correlación obtenidos para cada una son: *Klebsiella pneumoniae* ( $r=0.99078$ ), *Staphylococcus aureus* ( $r=0.99023$ ) y *Escherihcia coli* ( $r=0.99248$ ).

Para esto se obtuvo proteína soluble total (PST) de las hojas de los tabacos infiltrados se cuantificó por el método de Bradford, se realizaron ensayos antimicrobianos en medio líquido, para posteriormente cuantificar células viables al sembrar en medio sólido y cuantificar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). De acuerdo con los rendimientos de producción de proteínas mediante el sistema Magniffection deberíamos de tener de 1 a 10  $\mu\text{g}$  de protegrina por cada 100  $\mu\text{g}$  de PST) (Gleba y col., 2005). Se utilizó como control positivo protegrina-1 pura sintetizada químicamente, la cual fue donada por el Dr. Robert Lehrer (UCLA/USA), además se realizó una curva de concentración con el fin de interpolar los datos obtenidos con los extractos proteicos y así estimar la concentración de protegrina producida por el método de Magniffection, con base en la actividad antimicrobiana, usando el método de

regresión lineal (Figura 12), para el cual se utilizaron tres cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*.



**Figura 12.** Curva dosis-respuesta de protegrina-1 sobre tres cepas bacterianas. Cultivos líquidos bacterianos se incubaron con diferentes concentraciones de protegrina-1 y a las 12 horas se cuantificó el número de bacterias por el método de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Los puntos sobre la gráfica corresponden al promedio del triplicado de cada experimento. La ecuación de la recta se obtuvo usando el método de regresión lineal. *Klebsiella pneumoniae* [ $Y=(-115055 \cdot X)+1 \times 10^6$ ] ( $r=0.99078$ ), *Staphylococcus aureus* [ $Y=(-112396 \cdot X)+1 \times 10^6$ ] ( $r=0.99023$ ), *Escherichia coli* [ $Y=(-90110 \cdot X)+865476$ ] ( $r=0.99248$ ).

Posteriormente procedimos a determinar la actividad antimicrobiana en los extractos proteicos de nuestros tabacos transformados, y compararlos contra la protegrina pura, utilizando las mismas tres cepas bacterianas del ensayo anterior, más la bacteria *Mycobacterium bovis* y el hongo *Candida albicans*. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana del extracto proteico de las plantas infectadas con el vector pICHPG1. Los datos representan el promedio de tres experimentos.

Cepas	CFU/mL				% de reducción en la población microbiana
	Control (Sin extracto de PTS)	Extracto proteico de las plantas infectadas con pICHGFP	Extracto proteico de las plantas infectadas con pICHPG1	Protegrina-1 (5 µg/mL)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.17 x 10 <sup>6</sup> ± 47140	5.4 x 10 <sup>5</sup> ± 89628 *	6.0 x 10 <sup>5</sup> ± 173205 *	53.2 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup> ± 100000	3.2 x 10 <sup>5</sup> ± 40414 *	4.4 x 10 <sup>5</sup> ± 191398 *	70.2 %
<i>Escherichia coli</i>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	9.0 x 10 <sup>5</sup> ± 40824	3.9 x 10 <sup>5</sup> ± 70000 *	4.1 x 10 <sup>5</sup> ± 76376 *	56.6 %
<i>Mycobacterium bovis</i>	—	9.0 x 10 <sup>5</sup> ± 141421	2.5 x 10 <sup>5</sup> ± 70710 *	—	72.0 %
<i>Candida albicans</i>	—	2.1 x 10 <sup>6</sup> ± 88800	6.3 x 10 <sup>5</sup> ± 309450 *	—	70.0 %

La suspensión microbiana fue ajustada a una densidad de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL. La cepas usadas en este estudio son; *Klebsiella pneumoniae* (muestra clínica, API-20), *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 25923), *Escherichia coli* (ATCC No. 25619), *Mycobacterium bovis* (BCG Pasteur 1173P2) y *Candida albicans* (CA14). Los asteriscos (\*) indican diferencia significativa de los extractos proteicos de las plantas infectadas ( $p \leq 0.05$ ), la cual fue determinado por Student's t-test.

De acuerdo con los resultados obtenidos, al utilizar 100 µg de PST se produjo una inhibición de crecimiento del 53.2 % en *K. pneumoniae*, del 70.2%

---

en *S. aureus*, del 56.6 en *E. coli*, del 72.0% en *M. bovis* y del 70.0% en *C. albicans*. Por el contrario, al utilizar el extracto proteico de la línea que expresa GFP no se produjo reducción del número de UFC; por lo tanto, el efecto antimicrobiano observado en los extractos de la línea transformada transitoriamente que expresa PG1 se puede atribuir a la actividad biológica de la protegrina-1 producida en las hojas de tabaco. Aunque la curva dosis-respuesta se obtuvo de una protegrina pura sintetizada químicamente y no de una producida en plantas, realizamos una estimación de la concentración de protegrina recombinante producida al interpolar los datos de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos de tabaco en la curva de dosis-respuesta de la protegrina pura y realizando los cálculos correspondientes con el método de regresión lineal. Se obtuvieron distintas concentraciones de protegrina dependiendo de la bacteria utilizada en el ensayo: en base a la actividad inhibitoria en contra de *K. pneumoniae* se estimó una concentración de protegrina de 3.93 µg/mL, en contra de *S. aureus* una concentración de 5.98 µg/mL y en contra de *E. coli* una concentración de 5.27 µg/mL de protegrina. Con estos resultados se puede estimar una concentración promedio de protegrina producida en tabaco por el método de Magniffection, de  $5.06 \pm 1.04$  µg/mL de protegrina-1 recombinante biológicamente activa. Puesto que en los ensayos antimicrobianos se utilizaron 100 µg de PST, estimamos que la protegrina recombinante biológicamente activa se encuentra en una proporción del 4-6% de la proteína total soluble que se produce en los tabacos infiltrados por Magniffection.

Es importante mencionar que con un Western blot o un ELISA específico para protegrina la cuantificación de proteínas sería más precisa, sin embargo, estos procedimientos podrían arrojar concentraciones mayores de la protegrina ya que detectan tanto péptidos activos como inactivos que no se hayan procesado correctamente (falta de formación de puentes disulfuro), que se hayan degradado parcialmente o que se hayan acomplexado con otras proteínas (Morassutti y col., 2002). Por tal motivo, los datos de actividad biológica son más relevantes (Seung-Bum y col., 2010). Existen diferencias entre la concentración estimada en las distintas cepas de bacterias analizadas, debido a que la actividad de la protegrina depende de la composición de la membrana lipídica de las bacterias (Ogata y col., 1992; Boman, 1995), además

---

de que la presencia de pared celular puede cambiar la actividad de la protegrina, aumentando la actividad en caso de que la pared funcione como un concentrador de péptido antimicrobiano o bien reduciendo la actividad al no permitir que el péptido llegue a la membrana, por tal motivo la actividad antimicrobiana puede variar entre diversas cepas bacterianas debido a las mínimas diferencias de la composición química de la membrana y pared celular (López-Brea 1999; Bruno y col., 2006). Como se mencionó anteriormente, para estos ensayos se utilizó una línea de tabaco la cual produce bajo nivel de alcaloides (Menassa y col., 2007), y logramos observar que en nuestros resultados del control usando extracto proteico de la línea silvestre, no existe diferencia significativa al reducir el número de UFC al compararlo con el buffer de extracción.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de no tener una actividad antimicrobiana dependiente de alcaloides, en el presente trabajo se utilizó una línea de tabaco la cual produce bajos niveles de ellos (Menassa y col., 2007). De hecho los extractos proteicos de esta línea, sin transformar, no mostraron actividad antimicrobiana y el crecimiento bacteriano fue similar al de los cultivos que no recibieron ningún tratamiento con extractos de proteínas.

Existen reportes que concuerdan con nuestros resultados, como el de la expresión transitoria usando vectores virales para la producción de péptidos antimicrobianos descrita por Saitoh y col. en el 2001, donde expresan un péptido antimicrobiano de la clase de las defensinas llamado WT1, utilizando un sistema basado en el virus X de la papa, y expresan el péptido en plantas de *Nicotiana benthamiana*. El péptido WT1 resultó ser efectivo en ensayos *in vitro* contra patógenos de plantas como *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas cichorii*. Además, no solo se ha utilizado el sistema de expresión viral para producir péptidos antimicrobianos efectivos contra patógenos de plantas, si no también se han expresado péptidos antimicrobianos efectivos contra patógenos de humanos, como el péptido hLfN que fue expresado en *N. benthamiana* usando el sistema basado en el virus X de la papa, donde obtuvieron alrededor de 0.6% de proteína soluble total del péptido recombinante, que además, es efectivo en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (Li y col., 2003).



---

La protegrina-1 es un péptido antimicrobiano que ya se encuentra en fase III de desarrollo (Intrabiotics), y está destinada al tratamiento de infecciones peritoneales contra *P. aureoginosa* y *S. aureus*. Análogos de la protegrina se han utilizado para contrarrestar infecciones como la mucositis oral, donde la protegrina IB367 reduce significativamente la microflora bacteriana en un modelo de hámster (Chen y col., 2000). Cabe destacar que la protegrina IB367 está en fase II de desarrollo en un fármaco llamado Iseganan que se administra en forma de aerosol. Esta protegrina IB367 está diseñada para reducir las infecciones de vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística y pacientes con infecciones respiratorias crónicas. Estas observaciones corroboran la factibilidad de usar a la protegrina-1 aquí producida en tabaco, para contrarrestar infecciones respiratorias como tuberculosis o neumonía.

La efectividad de la protegrina-1 contra los patógenos humanos utilizados en este estudio está claramente documentada. Por ejemplo, se ha descrito la actividad de la protegrina contra infecciones peritoneales causadas por *Staphylococcus aureus*, su efectividad contra *Escherichia coli* está claramente documentada en experimentos *in vitro* con la protegrina pura, además de que se ha demostrado que el péptido antimicrobiano posee un efecto de amplio espectro (Steinberg y col., 1997); de igual modo se ha demostrado que la protegrina es letal contra levaduras de *Candida albicans*, a una concentración de  $0.38 \pm 0.02 \mu\text{M}$  (Cho y col., 1998). Además, la protegrina-1 es efectiva contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y RM22, mostrando actividad sinérgica con isoniazida, con una inhibición del crecimiento del 100% (Miyakawa y col., 1996).

Los péptidos antimicrobianos como la protegrina-1 no solo poseen propiedades antimicrobianas, sino que también poseen actividad antitumoral, debido a que las células tumorales cambian la composición de su membrana lipídica, haciéndolas más susceptibles a la acción antimicrobiana de la protegrina (Kamysz y col., 2003). También se ha descrito que actúan como mitógenos, similar a las defensinas, ya que estimulan el crecimiento de los fibroblastos y células epiteliales en experimentos *in vitro* (Murphy y col., 1993). Estos resultados sugieren que las defensinas pueden tener un doble papel en

---

las lesiones de la piel, razón por la cual la protegrina-1 es usada en pacientes con quemaduras graves, ya que previenen infecciones nosocomiales, y además poseen efecto mitogénico. Los péptidos antimicrobianos como las defensinas humanas (HNP-1, HNP-2 y HNP-3) también poseen un papel de moléculas de señalización, ya que inhiben a la proteína kinasa, que es una proteína involucrada en diferentes rutas de transducción de señales (Charp y col., 1988).

De todo lo anteriormente expuesto podemos concluir que las plantas se presentan como un sistema con numerosas ventajas frente a los otros sistemas disponibles para la producción de proteínas recombinantes de aplicación terapéutica o industrial de tal forma que empresas como MedicaGo en Quebec o Fraunhofer en Newark, están invirtiendo fuertemente en este sistema para producción de fármacos y se encuentran en pruebas de fase clínicas II

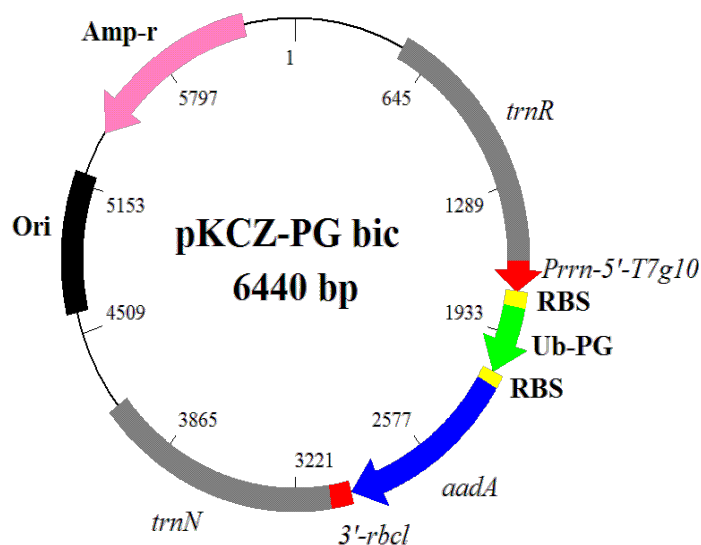
---

## CAPÍTULO 2

### TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS DE TABACO

#### 6.1 Construcción de vectores bicistrónicos para bombardeo de tabaco

Para la transformación de cloroplastos de tabaco se partió del gen bicistrónico denominado pKCZ-PG1 bic previamente reportado en la tesis de Patiño-Rodríguez en el 2007, y Herrera-Díaz 2005. En la Figura 13 se muestra el mapa general del vector bicistrónico para la transformación de cloroplastos.

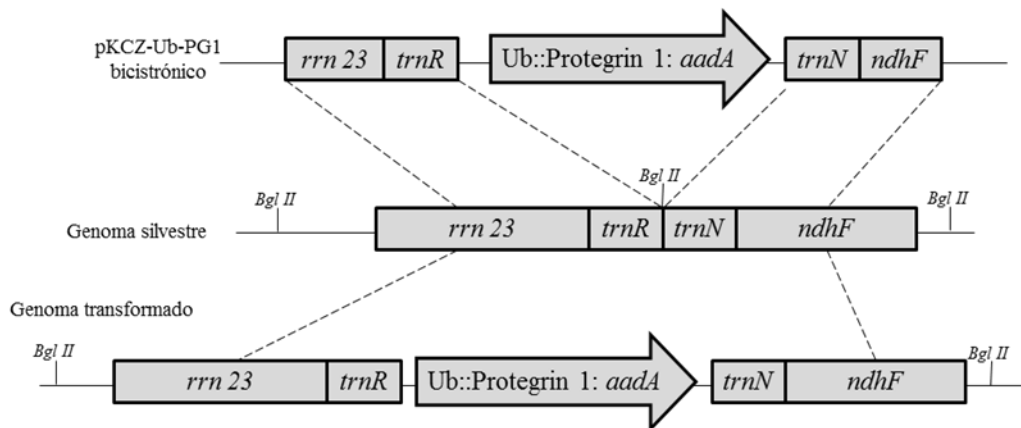


**Figura 13.** Mapa físico del vector bicistrónico pKCZ-UbPG1. Amp-r, resistencia a ampicilina o carbenicilina; Ori, origen de replicación de *E. coli*; *trnN*, sitio de recombinación homóloga en cloroplastos de tabaco correspondiente al gen del tRNA del aminoácido N (Asparagina); *3'-rbcL*, región 3'-UTR del gen de la rubisco; *aadA*, gen de selección a espectinomicina; RBS, sitio de unión a ribosomas; Ub-PG, gen de la ubiquitina-protegrina; *Prn*, promotor constitutivo de cloroplasto, correspondiente al promotor de los RNA ribosomales; *5'T7g10*, región 5'-UTR del gen 10 del fago T7; *trnR*, sitio de recombinación homóloga en cloroplastos de tabaco correspondiente al gen del tRNA del aminoácido R (Arginina).

La inserción del gen *aadA* (gen de selección a espectinomicina) en los vectores bicistrónicos con las protegrinas se diseñó con la finalidad, de que el gen de selección se expresara al igual que la protegrina, para que con un solo evento de transformación se logaran tener brotes transformantes que sean capaces de expresar el gen *aadA* en medio selectivo con espectinomicina, y capaces de producir la protegrina.

El vector original pKCZ, donado por el Profesor Koop, presenta un promotor *Prn* que dirige la expresión del gen *aadA* en una orientación tal que al recombinar e integrarse en el genoma del cloroplasto podría posteriormente recombinar con el promotor homólogo presente en el genoma y ocasionar la

delección del transgén insertado; además, si insertáramos la PG-1 con otro promotor *Prrn* pudiera también recombinar con el promotor del vector, por lo que se decidió eliminar ese promotor y el gen de selección, y se hizo una construcción bicistrónica que tuviera un solo promotor *Prrn* dirigiendo la expresión de PG-1 y del gen de selección separados por un sitio de unión al ribosoma. El vector pKCZ posee sitios de recombinación homóloga para tabaco (*trnR-ACG* y *trnN-GUU*), esta característica le confiere la particularidad de poder recombinar con sitios específicos del genoma de cloroplasto de tabaco y de esta forma insertar el cassette de expresión en el mismo. En la Figura 14 se representa esquemáticamente como se lleva a cabo la doble recombinación homóloga para la transformación de cloroplastos de tabaco.



**Figura 14.** Diagrama general de la recombinación homóloga en cloroplastos. *trnR*, gen del tRNA del aminoácido R (Arginina); *trnN*, gen del tRNA del aminoácido N (Asparagina); *Prrn*, promotor constitutivo de cloroplasto de los RNAs de transferencia; 5'-*T7g10*, región 5' no traducible del gen 10 del fago T7; Ub-PG1, gen de la ubiquitina-protegrina; *aadA*, gen de selección a espectinomicina; 3'-*rbcl*, región 3' no traducible de la subunidad grande de la rubisco; *Bgl II*, sitio de corte de la enzima de restricción *Bgl II*.

## 6.2 Transformación de cloroplastos de tabaco

Se transformaron hojas de 3 a 4 semanas de edad de *Nicotiana tabacum* var. Petit Habana, las cuales fueron bombardeadas por la cara adaxial usando partículas de oro de 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro cubiertas de ADN plasmídico, el bombardeo se realizó usando un dispositivo llamado "PDS-1100/He Biolistic Particle Delivery System" (BIO-RAD, Hercules, USA). Las hojas de tabaco, después del bombardeo se colocaron en medio de selección RMOP (sin antibiótico), donde se incubaron durante 3 días para posteriormente cortarlas en fragmentos de 1 mm x 1 mm, y fueron incubados nuevamente en el medio RMOP (500 mg/L de espectinomicina). Los fragmentos de hoja a los 7 días

---

después de colocados en el medio de selección se tornaron a una coloración amarilla o blanca, además presentaron un engrosamiento que comenzaba a dar el aspecto de callo, y los primeros callos verdes fueron observados aproximadamente a 2-2.5 meses. La eficiencia de regeneración para las hojas fue de 1-3 brotes verdes por disparo, lo cual corresponde aproximadamente solo al 1% de eficiencia de regeneración. Los brotes transformantes fueron completamente evidentes debido a que la hoja se tornaba de un color oscuro y los brotes se tornaban de un color verde-amarillo.

Los brotes transformantes se cortaron y se colocaron en medio de selección para micropropagarlos y obtener suficiente material para los ensayos siguientes.

Aproximadamente tras 4- 4.5 meses de regeneración los callos verdes fueron colocados en medio MS0 con espectinomicina (500 mg/L) para favorecer la formación de brotes; una vez formados brotes verdes de aproximadamente 2-3 cm de altura, se cortaba una hoja y se colocaba en medio RMOP con espectinomicina (500 mg/L) con la finalidad de formar nuevamente callo y favorecer la homoplastía; a este paso se le llamó “ronda de selección” y por lo menos se realizaron tres rondas de selección para generar los tabacos transplastómicos. Al finalizar la tercera ronda de selección, los brotes verdes fueron cortados desde la parte inferior del tallo y fueron colocados en medio MS0 con espectinomicina (500 mg/L) para favorecer la formación de raíz (Figura 14A). Una vez formada la raíz los tabacos transplastómicos fueron pasados a tierra (Figura 14B). Estos tabacos transplastómicos, que representan la línea T0, mostraron un crecimiento anormal con respecto a los tabacos silvestres (Figura 15C), por ejemplo, el crecimiento era más reducido; de las 5 líneas de tabaco transplastómicas solo una fue capaz de formar semilla, las otras cuatro líneas fueron incapaces de formar semilla viable (Figura 15D).

**A**

**B**



C

D



**Figura 15.** Plantas transplastómicas de tabaco. A) Brotes verdes probables transplastómicos capaces de crecer en medio con espectinomomicina (500 mg/L), B) Tabacos transplastómicos pasados a tierra (3 semanas), C) Observación de las líneas de tabaco transplastómicas que expresan la protegrina 1, D) Comparación de las semillas de la línea silvestre con la línea transplastómica 1 de tabaco, WT, línea de tabaco silvestre; LT1, línea de tabaco transplástico 1.

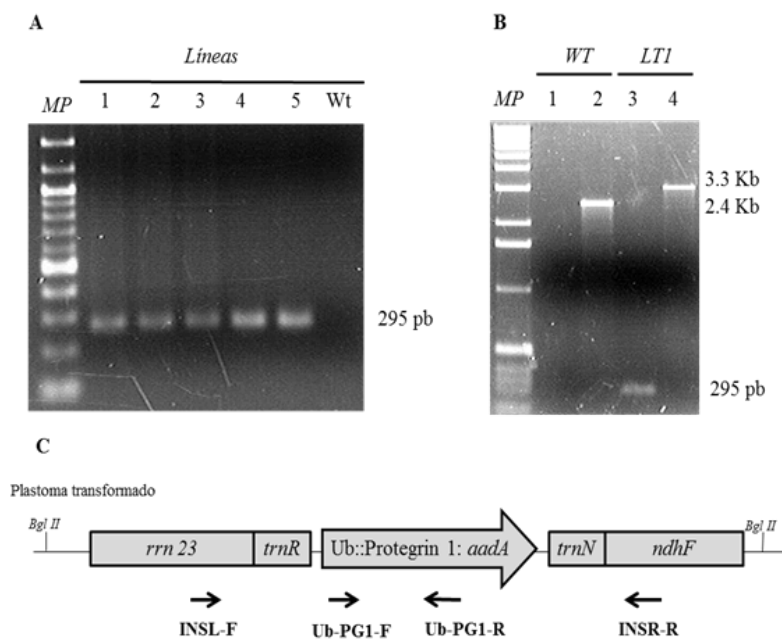
La línea transplastómica de tabaco que fue capaz de dar semilla se denominó “LT1” y se logró obtener una gran cantidad de semilla de la cual se obtuvieron las siguientes líneas transplastómicas derivadas de la línea LT1.

Según lo descrito por DeGray y col., en el 2001, los resultados del deficiente crecimiento y la baja producción de semilla, no podría ser debido a la producción de la protegrina en el cloroplasto de tabaco, ya que se ha descrito ampliamente que los péptidos antimicrobianos no afectan al organelo debido a que la membrana tilacoidal interna del cloroplasto consiste en una envoltura primaria de glicolípidos y galactolípidos en vez de fosfolípidos; que se constituye arriba del 50% de monogalactosildiácil glicerol y el 30% de digalactosildiácil glicerol (Siegenthaler y col., 1998), que confieren carga neutra o positiva a la membrana, lo cual inhibe el efecto antimicrobiano de la protegrina en el cloroplasto. Las deficiencias en el crecimiento y

malformaciones así como la baja producción de semilla, pueden ser debido a variaciones somaclonales de la técnica de cultivo de tejidos que puede generar efectos epigenéticos o al daño causado por la balística *per se* (Smulders y col., 2010; Park y col., 2009). Cabe resaltar que la línea T1 que expresa la protegrina, fue capaz de crecer y desarrollarse normalmente.

### 6.3 Análisis por PCR de los brotes transformantes

El primer ensayo para demostrar la transformación de los cloroplastos de tabaco con el gen de la protegrina 1 fue el análisis por PCR de las líneas transplastómicas, por lo que fue necesario extraer ADN de las hojas de las diferentes líneas como se describe en la metodología, para posteriormente realizar el ensayo de PCR. Se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos, con el fin de saber si se encontraba presente el gen de la protegrina, y posteriormente utilizando oligos que amplifican en el genoma del cloroplasto para verificar la integración del transgén al genoma. En la Figura 16 se muestran los resultados del análisis de PCR de 5 líneas transplastómicas.



**Figura 16.** Análisis de PCR de los tabacos transplastómicos. A) PCR de las 5 líneas transplastómicas usando los oligos PG1-F y PG1-R que amplifican el gen de la ubiquitina-protegrina de aproximadamente 295 pb; MW, marcador de peso molecular de 100 pb. B) PCR

---

de la línea LT1 y de la línea silvestre (WT) usando oligos que amplifican la región de recombinación homóloga, con el fin de verificar la integración al genoma de cloroplasto, al usar los oligos INSL-F y INSR-R. Carriles 1 y 3, amplificación usando los oligos PG1-F y PG1-R para dar un amplicón de 295 pb solo en la línea transplastómica (LT1 carril 3); Carriles 2 y 4, en el genoma silvestre se obtiene un amplicón de 2.4 kb al usar los oligos INSR-F y NSR-R, mientras que en el de la línea transplastómica 1 (LT1) se obtiene un amplicón de 3.3 kb; MW, marcador de peso molecular de 1 kb.

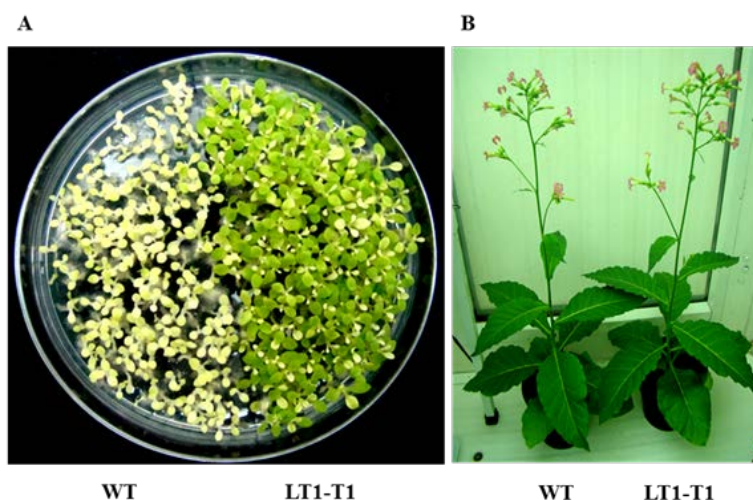
Al realizar el análisis por PCR de las 5 líneas transplastómicas provenientes del cultivo de tejidos, se generó un fragmento de 295 pb con los oligos específicos del gen de la ubiquitina-protegrina, correspondiente al peso esperado del amplicón, por el contrario no hubo amplificación en la línea silvestre sin transformar. Este resultado nos confirma que en la célula vegetal, está presente el gen de interés, sin embargo, no proporciona la información de que esté integrado en el genoma. Por tal motivo fué necesario realizar otro análisis de PCR usando oligos que amplificaran la zona de recombinación homóloga. Se diseñaron oligos que flanquearan la zona de recombinación homóloga, abarcando los genes del *trnN* y *trnR*, estos oligos se denominaron INSL-F y INSR-R. Al realizar el ensayo de PCR los resultados mostraron que en la línea silvestre, se amplificó un fragmento de 2.4 kb correspondiente a la zona de recombinación homóloga, mientras que al hacer el mismo ensayo en la línea LT1 se amplificó un fragmento de 3.3 kb que corresponde a la zona de recombinación homóloga más el inserto del gen bicistrónico de la ubiquitina-protegrina y el gen de selección a espectinomicina (*aadA*). Estos resultados demuestran que existe la integración al genoma del cloroplasto de tabaco. Adicionalmente se realizó un ensayos de Southern blot con el fin de corroborar la integración al genoma y verificar la homoplastía.

#### **6.4 Obtención de la línea T1 y experimento de germinación en presencia del agente de selección**

La línea transplastómica de tabaco T1 se obtuvo a partir de las semillas de la línea T0. El primer experimento para corroborar la estabilidad de la transformante fue germinar las semillas en medio MS0 con espectinomicina (50 mg/L), ya que solo las semillas que tuviesen el gen bicistrónico serían capaces de crecer en este medio, mientras las semillas de la línea silvestre mostrarían un fenotipo albino. Posteriormente los tabacos adultos se usaron para realizar los análisis de integridad del transgén, transcripción del mismo y ensayos de



actividad biológica. En la Figura 17 se muestra el ensayo de germinación en medio con antibiótico así como el aspecto fenotípico de los tabacos de la línea LT1-T1.



**Figura 17.** Experimento de germinación de las semillas en medio MS0 con espectinomicina (50 mg/L). A) a la izquierda con un fenotipo albino las semillas correspondientes a la línea silvestre, a la derecha las semillas correspondientes a la línea transplastómica de tabaco LT1-T1 con fenotipo de resistencia al antibiótico. B) Aspecto fenotípico de las plantas adultas de la línea silvestre y de la línea LT1-T1 (1.5-2 meses).

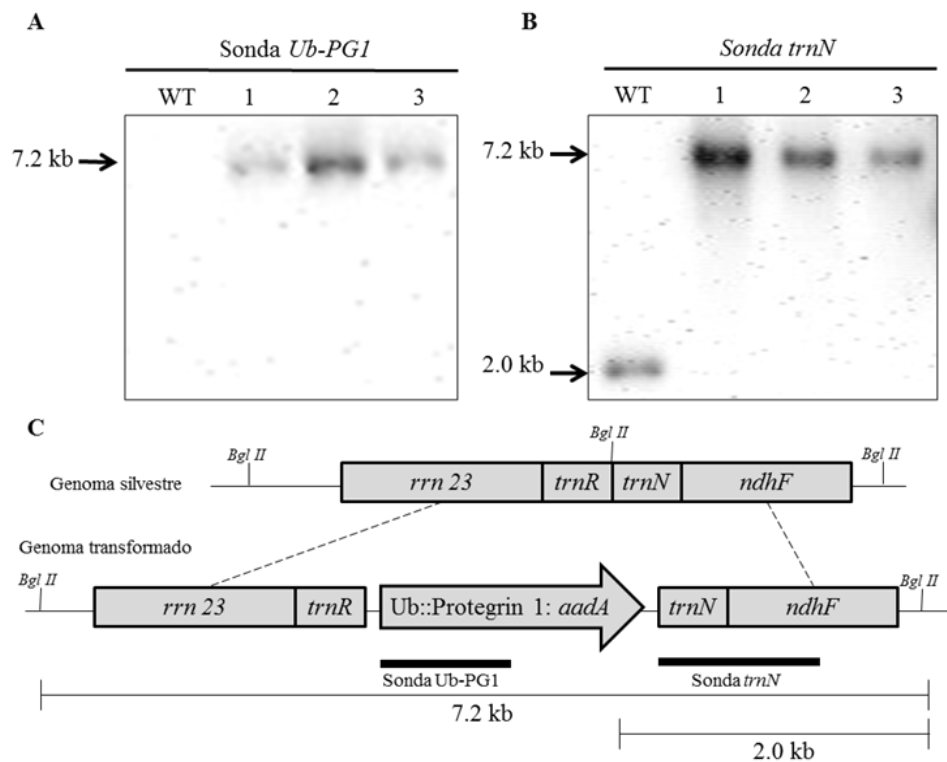
Las semillas silvestres de tabaco al ser germinadas en medio con espectinomicina presentan un fenotipo albino, tienen un retardo en su crecimiento y tras un periodo aproximado de 2-3 semanas mueren. Sin embargo, las semillas correspondientes a la línea transplastómica LT1-T1 fueron capaces de crecer y desarrollarse normalmente en el medio selectivo (Figura 17A). A partir de los resultados de este experimento podemos concluir que la transformación de cloroplastos fue estable, ya que se mantuvo el fenotipo de resistencia a espectinomicina en la progenie, por lo que se infiere que el gen bicistrónico que expresa la protegrina y el gen de selección a espectinomicina se conservó en la progenie. Cabe mencionar que la concentración de espectinomicina fue reducida a 50 mg/L en los experimentos de germinación ya que la semilla es altamente sensible aún a bajas concentraciones, sin embargo, si se desea realizar cultivo de tejidos con hojas de tabaco, realizando organogénesis u otra técnica de cultivo en donde se utilice a la hoja de tabaco como explante, es necesario utilizar 500 mg/L de espectinomicina.

---

Otra observación muy importante en la línea T1 fue que al germinarla en tierra presentó un fenotipo idéntico al de la línea silvestre (Figura 17B), resultados contrastantes con los observados en la línea T0, en donde fue posible observar algunos cambios morfológicos en la estructura de la planta adulta y la T0 presentó una reducida producción de semilla (Figura 15C y D).

### **6.5 Análisis de Southern blot de los tabacos transplastómicos**

Con el fin de realizar un ensayo confirmatorio de la integración del transgén en el genoma del cloroplasto de tabaco, se decidió realizar el ensayo de Southern blot. Para ello se marcó una sonda específica para identificar al gen ubiquitina-protegrina utilizando los oligos Ub-PG1-F y Ub-PG1-R y como templado el vector pKCZ-PG1 bicistrónico, de modo que se generó una sonda no radioactiva específica de 295 pb, cuyo resultado positivo en las líneas transplastómicas de tabaco confirman la presencia del gen. Para detectar la integración al genoma de cloroplasto fue necesario marcar una segunda sonda en uno de los sitios de recombinación homóloga (*trnN*) de modo que al digerir con la enzima *Bgl*I el genoma transformado correspondería a un peso molecular más elevado que en el genoma no transformado. En la Figura 18 se muestra el análisis de Southern blot con ambas sondas así como el mapa de restricción y la localización física de la sonda.



**Figura 18.** Análisis de Southern blot para detección del gen de la protegrina-1. A) Análisis de Southern blot con la sonda Ub-PG1. B) Análisis de Southern blot con la sonda *trnN*. C) Mapa de restricción del genoma silvestre y del genoma transformado.

Al realizar el ensayo de Southern blot utilizando la sonda específica para la Ub-PG1 y digiriendo el ADN total con la enzima *Bgl*II logramos detectar una banda correspondiente al peso molecular de 7.2 kb en tres líneas transplastómicas analizadas, mientras que en la línea silvestre no se detectó señal alguna como se esperaba. Este resultado es confirmatorio de la presencia del transgén en las líneas transplastómicas, sin embargo, para confirmar la integración al genoma de cloroplasto, fue necesario realizar un ensayo de Southern blot usando una sonda que se hibridara en una de las zonas de recombinación homóloga. En el genoma de cloroplasto de tabaco silvestre se encuentran naturalmente tres sitios de corte de la enzima *Bgl*II en la zona de recombinación homóloga donde se encuentran los genes *rrn23-trnR/trnN-ndhF*, por lo tanto al digerir totalmente el genoma silvestre de cloroplastos y utilizar una sonda que detecta el gen *trnN* se debe detectar una señal con el peso molecular de 2.0 kb. Sin embargo, al transformar el genoma de cloroplastos en este mismo sitio se pierde uno de los sitios de corte de la enzima *Bgl*II, por lo tanto, el resultado de la señal usando la sonda contra el gen *trnN* es posible detectar la señal correspondiente al peso molecular de 7.2

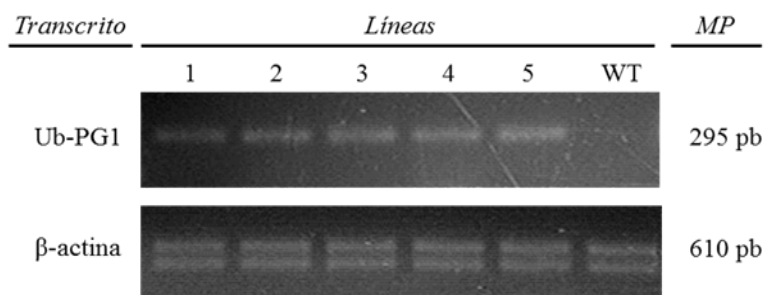
---

kb que incluye la zona de recombinación homóloga junto con el gen bicistrónico que expresa la ubiquitina-protegrina y el agente de selección a espectinomicina (*rrn23-trnR/Ub-PG1-aadA/trnN-ndhF*), lo cual describe en la Figura 18C.

Los resultados arrojados por del Southern blot con la sonda *trnN*, son datos concluyentes con respecto a la integración en el genoma de cloroplastos de tabaco, así como nos puede servir para inferir el grado de homoplastía de los cloroplastos, ya que si solo observamos la banda de 7.2 kb y no vemos la de 2.0 kb se infiere, que los tabacos transplastómicos son homoplastómicos como se ve en la Fig. 18C. Una vez confirmada la integración del transgén en el genoma de cloroplastos fue necesario verificar que la construcción integrada fuera funcional en el interior del cloroplasto, por lo tanto fue necesario corroborar el proceso de transcripción del transgén por análisis de RT-PCR que se describe en el apartado siguiente.

### 6.6 Análisis de RT-PCR de los tabacos transplastómicos

Con el fin de confirmar que el transgén era capaz de transcribirse, fue necesario realizar ensayos de RT-PCR, por lo que se extrajo el ARN total y a partir de este, se realizó la síntesis de ADNc con el fin de realizar ensayos de PCR, tomando como templado el ADNc. Se realizó la PCR utilizando los oligos que amplifican el gen de la ubiquitina-protegrina (Ub-PG1-F + Ub-PG1-R) por lo que se esperaba un amplicón de 295 pb. Se utilizó como control de carga la amplificación del gen de la  $\beta$ -actina de maíz, tanto para la línea silvestre como para las 5 líneas transplastómicas obtenidas. Los resultados de la RT-PCR se pueden observar en la Figura 19.



**Figura 19.** Análisis de RT-PCR de las líneas transplastómicas de tabaco que expresan la protegrina 1. Ub-PG1, amplicón de 295 pb esperado para la Ubiquitina-protegrina 1;  $\beta$ -actina, amplicón de 610 pb esperado para el gen usado como control de carga.

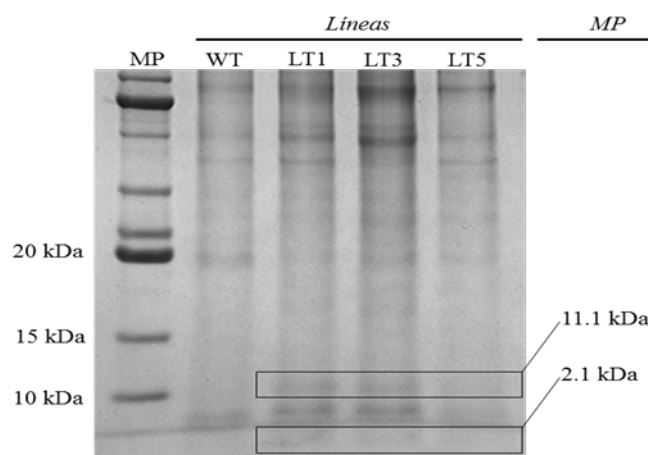
Se puede observar en los resultados del RT-PCR, que al utilizar los oligos que correspondientes al gen Ub-PG1 se logró obtener un amplicón de 295 pb, que confirma la presencia del transcrito en las 5 líneas transplastómicas, por el contrario en la línea silvestre no se observa la presencia del amplicón. Al mismo tiempo, fue posible observar el amplicón del gen de la actina de maíz (610 pb) en las cinco líneas transplastómicas y en la línea silvestre, por lo tanto estos resultados confirman la formación del transcrito en el cloroplasto de las líneas transformadas.

Una vez confirmada la formación del transcrito fue necesario realizar ensayos para detectar la proteína recombinante con análisis de geles de SDS-Poliacrilamida y con ensayos de Western blot.

## 6.7 Detección de la proteína recombinante

### 6.7.1 Análisis de SDS-PAGE de los tabacos transplastómicos

Con el fin de determinar si era posible observar una banda diferencial en los extractos proteicos de las líneas transplastómicas respecto a las silvestres, con el peso molecular esperado, decidimos realizar ensayos con geles de SDS-PAGE. Se tomaron aproximadamente 20  $\mu$ g de proteína soluble total (PST) de tres líneas transplastómicas junto con la silvestre y se corrieron en geles de SDS-Poliacrilamida al 16%. Los resultados se muestran en la Figura 20.



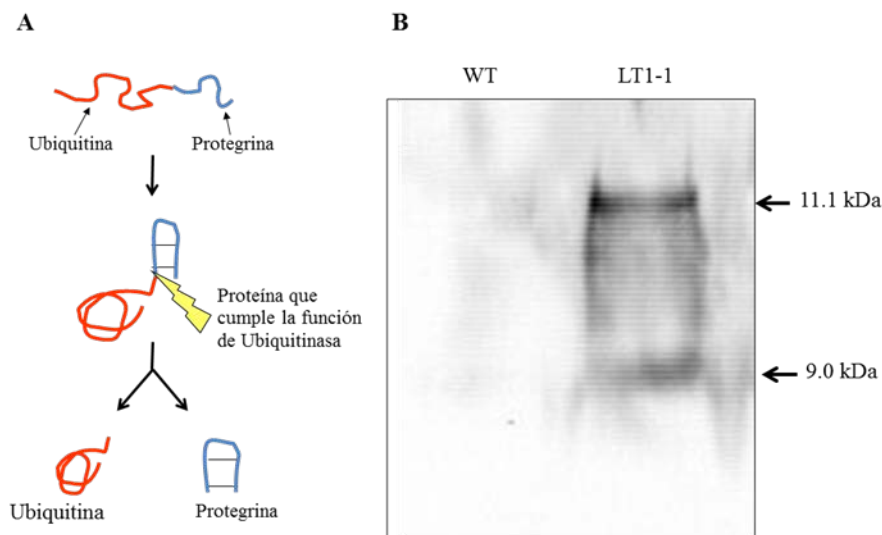
**Figura 20.** Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de PST de tres de las líneas transplastómicas y una silvestre (WT).

---

Como se distingue en el ensayo de SDS-PAGE se pueden diferenciar en las tres líneas transplastómicas, dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de 11.1 kDa y 2.1 kDa, las cuales podemos inferir que corresponden a la ubiquitina-protegrina (11.1 kDa) y a la protegrina procesada (2.1 kDa). En este experimento se esperaba detectar tres bandas diferenciales de los extractos de plantas transformadas con respecto a las no transformadas, la primera de un total de 11.1 kDa, que corresponde a la fusión traduccional de ubiquitina-protegrina, y posteriormente a los péptidos individuales ya procesados que son; la ubiquitina de 9.0 kDa y la protegrina de 2.1 kDa, no obstante, no fue posible concluir que la banda de 9.0 kDa corresponde a la ubiquitina procesada, ya que existe otra banda del mismo peso molecular presente en el extracto proteico silvestre. Sin embargo, este ensayo es preliminar ya que el ensayo concluyente para confirmar la presencia de la proteína es el análisis de Western blot el cual se describe a continuación.

#### **6.7.2 Análisis de Western blot de los tabacos transplastómicos**

El gen de la protegrina esta fusionado traduccionalmente con el gen de la ubiquitina, ya que se ha reportado que dicha fusión traduccional ayuda a la formación de puentes disulfuro en el interior del cloroplasto para posteriormente ser procesada y liberar la ubiquitina y el péptido con las modificaciones post-traduccionales (Figura 21A) (Staub y col., 2000). Una de las principales limitantes en realizar el análisis de Western blot es la inexistencia de anticuerpos anti-protegrina de forma comercial, lo que limita la detección directa del péptido recombinante en el extracto proteico de PST (Lee y col., 2011). Sin embargo, si contamos con el anticuerpo anti-ubiquitina se pueden realizar ensayos utilizando este anticuerpo para confirmar indirectamente la traducción del péptido recombinante. En la Figura 21B se muestra el resultado de Western blot del extracto proteico de la línea transplastómica LT1 y el extracto silvestre, para fines comparativos.



**Figura 21.** Análisis de Western blot del extracto proteico de la línea transplastómica LT1 y del extracto proteico de la línea silvestre. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-ubiquitina. A) Representación esquemática del procesamiento de la fusión Ubiquitina-Protegrina, B) Análisis de Western blot de la línea LT1-1 y WT.

En la Figura 21B podemos observar el resultado del Western blot que demuestra la presencia de la ubiquitina-protegrina sin procesar (11.1 kDa) y la ubiquitina procesada (9.0 kDa), lo que confirma la traducción de la proteína recombinante en el cloroplasto, y nos demuestran que se está llevando a cabo el procesamiento de la fusión de ubiquitina-protegrina. Por lo tanto, con la identificación de ambas versiones en el extracto proteico de la línea transplastómica se detecta indirectamente la presencia de la protegrina-1 en la PST, cabe mencionar que en el extracto proteico de la línea silvestre no se detectó señal. Con base en el análisis de pérdida de señal midiendo pixeles con el programa GelDock<sup>®</sup>, pudimos detectar que existe aproximadamente un 66-76% de procesamiento de la ubiquitina-protegrina a ubiquitina procesada.

Estos resultados apoyan la presencia de la protegrina y su procesamiento post-traducciona en el cloroplasto, sin embargo, la prueba principal de que ocurre una correcta traducción de la protegrina así como la formación adecuada de los puentes disulfuro, son los ensayos de actividad biológica.

El trabajo de Staub y col., en el 2000 demostró la importancia de la fusión de la ubiquitina para formar puentes disulfuro en la somatotropina, que posteriormente fue procesada y liberada funcionalmente activa en cloroplasto. Lo anterior se supone que es debido a la presencia de una enzima que cumple

---

la función de ubiquitinasa en el cloroplasto, que no ha sido descrita en el organelo, pero se asume que existe. El procesamiento y formación de puentes disulfuro se ha descrito ampliamente en la literatura, de tal forma que con los resultados descritos anteriormente podemos concluir que el procesamiento de la ubiquitina se está realizando y los ensayos biológicos podrían confirmar si se forman puentes disulfuro, con base en los reportes descritos por Staub y col., 2000.

## **6.8 Ensayos de actividad antimicrobiana**

### **6.8.1 Ensayos antimicrobianos con los extractos proteicos de los tabacos transplastómicos contra patógenos de humanos**

Dentro de las pruebas cruciales en la producción heteróloga de proteínas recombinantes se encuentra el análisis de la actividad del péptido que se expresa, lo que constituye la prueba fehaciente de la funcionalidad del sistema para producir la proteína que se desea estudiar (Aumelas y col., 1996).

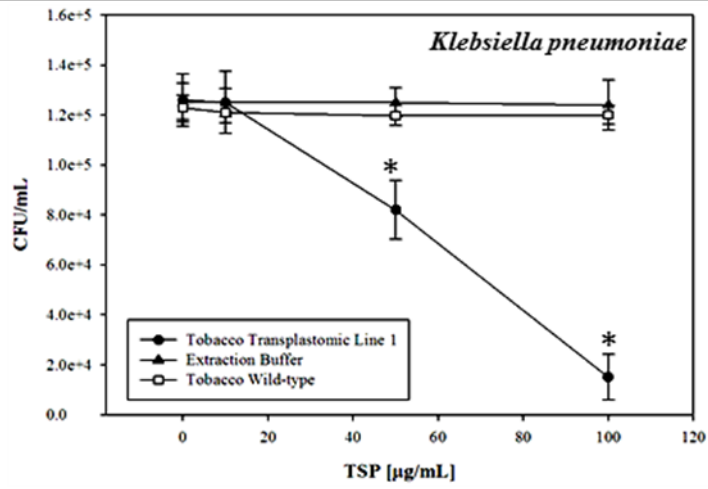
Las PST extraídas de los tabacos transplastómicos se cuantificaron por el método de Bradford y se realizaron ensayos antimicrobianos en medio líquido, para posteriormente cuantificar células viables al sembrar en medio sólido y cuantificar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). En teoría la concentración de proteínas totales solubles deberían tener entre 1-100 µg de protegrina (rangos usados para pruebas de antagonismos), asumiendo que se ha reportado anteriormente, que la transformación de cloroplastos muestra rendimientos por arriba del 10% de PST (Lee y col., 2011). De tal modo que se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones de 0, 10, 50 y 100 µg de proteína soluble total (TSP; por sus siglas en inglés Total Soluble Protein).

Se eligieron tres cepas para los ensayos antimicrobianos las cuales fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y finalmente con la colaboración del Dr. Mario Alberto Flores (CIATEJ) se lograron realizar ensayos contra *Mycobacterium bovis*.

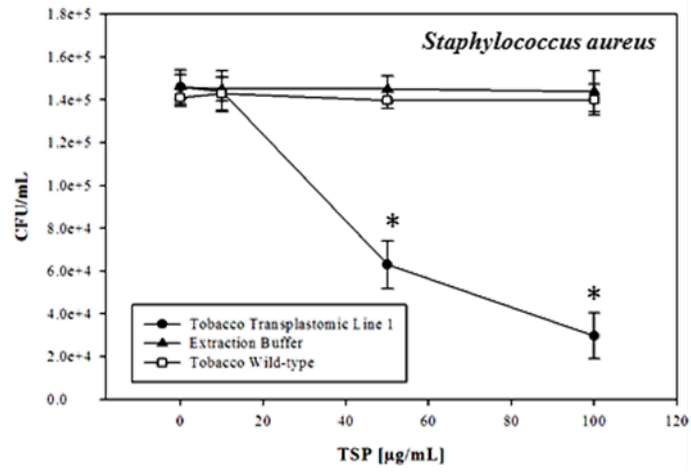
Los resultados de las cinéticas de actividad antimicrobiana de la protegrina-1 producida en cloroplastos de tabaco contra *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *E. coli* se muestran en la Figura 23.

A

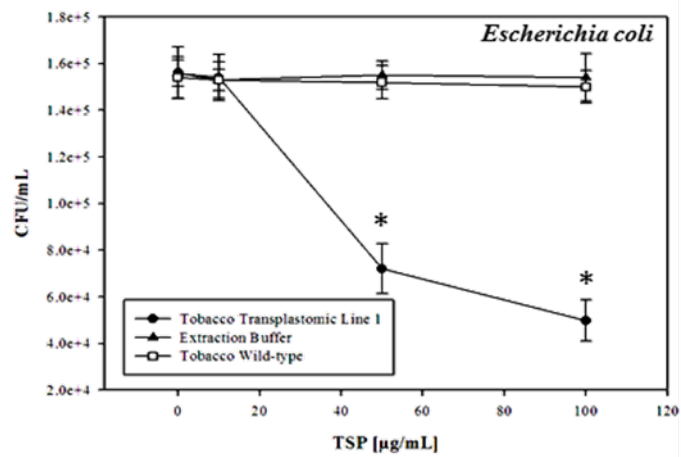




B



C

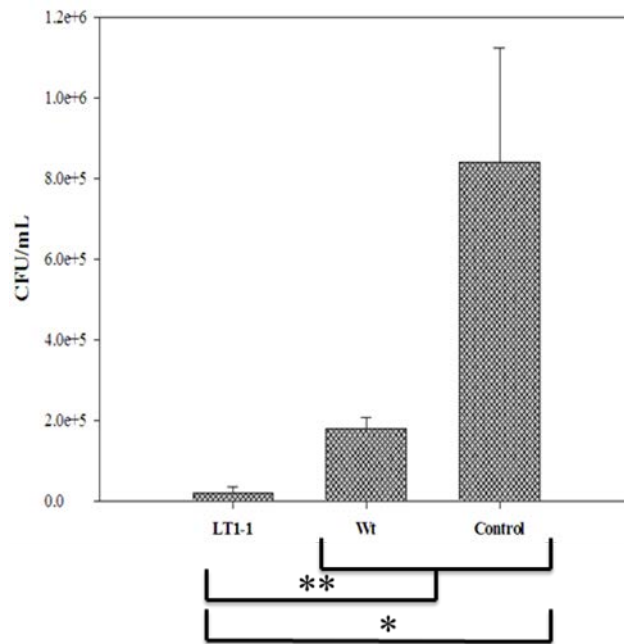


---

**Figura 22.** Ensayos antimicrobianos contra patógenos de humano. A) Cinética de inhibición de número de UFC contra *K. pneumoniae*. B) Cinética de inhibición de número de UFC contra *S. aureus*. C) Cinética de inhibición de número de UFC contra *K. pneumoniae*.  $n = 3$ , \*  $p \leq 0.05$ .

Con base en los ensayos antimicrobianos al utilizar 100 µg de proteína total soluble se produjo la inhibición del crecimiento en un 87.5% para *K. pneumoniae*, del 78.7% para *S. aureus*, y del 66.8% para *E. coli*. Por el contrario al utilizar el extracto proteico de la línea silvestre no se produjo reducción estadísticamente significativa del número de UFC, lo cual también se observó en el control de buffer de extracción. Por lo tanto la reducción del número de UFC en la línea transplastómica que expresa la PG1 se puede atribuir a la actividad biológica de la protegrina-1 producida en los cloroplastos de tabaco. Con los resultados positivos de la actividad biológica del péptido recombinante se confirma la capacidad de producir péptidos antimicrobianos en el cloroplasto, así como la funcionalidad de la fusión ubiquitina-protegrina para formar péptidos con modificaciones pos-traduccionales como los puentes disulfuro. En los resultados antimicrobianos pudimos observar una leve reducción en el número de UFC en el extracto de la línea silvestre al ser comparado con el buffer de extracción, pero no es estadísticamente significativo, por lo que el efecto del extracto proteico de la línea silvestre (WT) puede ser despreciable.

El ensayo antimicrobiano utilizando la cepa de *Mycobacterium bovis* se muestra en la Figura 23.



**Figura 23.** Ensayos antimicrobianos contra *Mycobacterium bovis* usando 100 µg de PST. LT1-1, línea transplastómica de tabaco que expresa la protegrina-1; WT, línea silvestre de tabaco; Control, buffer de extracción.  $n=3$ , \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

En este ensayo podemos observar que a pesar de que el extracto proteico de la línea silvestre provoca la inhibición del número de UFC, el extracto proteico de la línea transplastómica, que expresa la protegrina-1 disminuye aún más el número de UFC, al grado de que al comparar estadísticamente los resultados de la línea LT1 y la línea WT existe diferencia estadísticamente significativa. Con base en los resultados y tomando en cuenta que el crecimiento de línea WT representa el 100%, existe la inhibición del crecimiento de un 88.8% en *M. bovis* al ser comparado con la línea silvestre y que además estos resultados son estadísticamente significativos, es claro que existe un efecto sinérgico entre el o los compuestos que inhiben las UFC de la línea silvestre con el efecto de la protegrina-1. Como se mencionó anteriormente las plantas son capaces de producir de forma natural péptidos antimicrobianos como defensinas y thioninas, sin embargo, el efecto de estos péptidos no se ha reportado en cepas patógenas como *M. bovis*, por lo tanto los resultados observados con la línea WT podrían ser efecto del alto contenido de alcaloides en el tabaco, ya que no conocemos el efecto de dichos alcaloides en cepas atenuadas de *M. bovis* como la BCG Pasteur 1173P2. Sin embargo, estos resultados preliminares indican que es necesario probar el efecto del

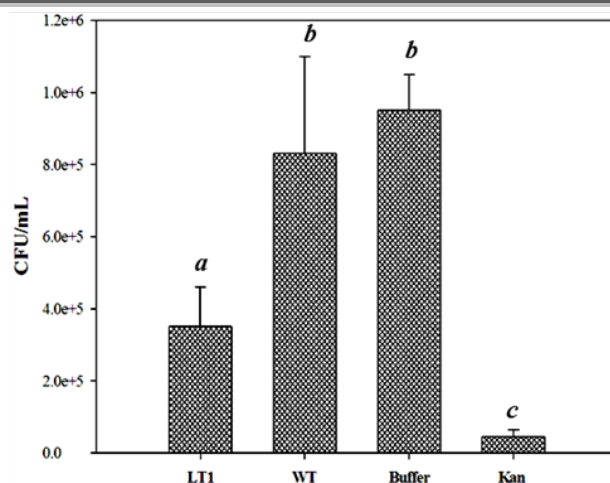
---

extracto proteico de plantas con bajo contenido de alcaloides, además de que es necesario realizar más ensayos antimicrobianos con el fin de eliminar el efecto de la proteína silvestre sobre el crecimiento de UFC de la bacteria *M. bovis*.

Con estos resultados podemos concluir que se está produciendo protegrina-1 en los cloroplastos de tabaco, y que además es biológicamente activa cuando se prueba con diversos patógenos de humano.

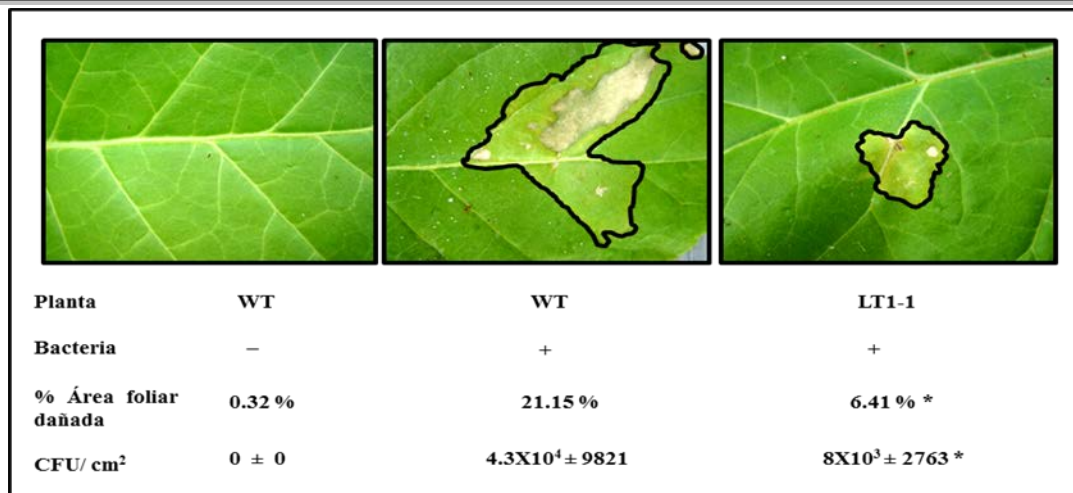
### **6.8.2 Ensayos antimicrobianos con los extractos proteicos de los tabacos transplastómicos contra patógenos de plantas**

Una vez realizadas todas las pruebas moleculares para verificar la transformación de cloroplastos de tabaco y haber probado la actividad antimicrobiana en los tabacos adultos, nos surgió la duda si la protegrina-1 podría tener efecto contra patógenos de plantas, se decidió realizar ensayos *in vitro* contra dos patógenos de plantas, los patógenos con los que se realizó la prueba fueron: *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*. Cabe destacar que en el experimento *in vitro* contra *P. syringae* la protegrina-1 no tuvo efecto, solo se observó efecto en contra de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (ambas bacterias patógenos de tomate). Los resultados del ensayo antimicrobiano contra *C. michiganensis* se pueden observar en la Figura 24.



**Figura 24.** Ensayo antimicrobiano *in vitro* contra *Clavibacter michiganensis* sub. *michiganensis* (cepa IFO). LT1, línea transplastómica de tabaco 1 que expresa la protegrina-1; WT, línea silvestre de tabaco; Buffer, control de buffer de extracción; Kan, control positivo con 50 µg/L de kanamicina. Los grupos a, b y c son diferentes significativamente con una  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ .

En la Figura 24 podemos observar que el extracto proteico de la planta transplastómica que expresa la protegrina-1 es capaz de reducir el número de UFC de *C. michiganensis* en un 57.8% con relación al control, además estos datos son estadísticamente significativos al comparar los resultados de la línea transplastómica con la línea silvestre. Estos datos sugieren que la protegrina-1 expresada en cloroplastos de tabaco le podría conferir resistencia a los tabacos adultos en un experimento en planta adulta, además de que se ha reportado la actividad biológica de la protegrina contra patógenos de plantas (Seung-Bum y col., 2010), lo que despertó el interés de realizar un experimento *in vivo* utilizando plantas adultas de tabaco para posteriormente ser infectadas con *C. michiganensis* y evaluar si la expresión de la protegrina le puede conferir resistencia a la enfermedad. Aunque *Clavibacter* ataca tomate, también produce enfermedad en tabaco ya que es una solanácea. Los resultados del experimento *in vivo* se muestran en la Figura 25.



**Figura 25.** Ensayos *in vivo* de resistencia a *Clavibacter michiganensis* con los tabacos transplastómicos que expresan la protegrina-1. LT1, línea transplastómica de tabaco que expresa la protegrina-1; WT, línea de tabaco silvestre. % Área foliar dañada, se calculó con el cien por ciento de área foliar relacionando el porcentaje que se mostraba con daño; CFU/cm<sup>2</sup>, es el número de unidades formadoras de colonias que crecieron en un centímetro cuadrado de hoja macerada con PBS y sembrada en medio sólido específico para crecimiento de *Clavibacter*.  $n = 5$ ,  $p \leq 0.05$ .

Con base en los resultados obtenidos en el experimento *in vivo* de los tabacos transplastómicos podemos decir que la expresión de la protegrina-1 le confiere en cierto grado resistencia a la enfermedad por *C. michiganensis*. Lo anterior lo podemos concluir al observar los datos de porcentaje foliar dañado ya que en la línea silvestre fue de un 21.15% mientras que en la línea transplastómica de tabaco fue de 6.41%, estos datos fueron corroborados al sembrar el extracto del macerado de las hojas infectadas con *Clavibacter* en medio sólido, donde se contaron las unidades formadoras de colonias y se obtuvo que para la línea silvestre fueron de  $4.3 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> mientras que para la línea transplastómica de tabaco fue de  $8 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, mostrando una reducción de un orden de magnitud estadísticamente significativa con cinco repeticiones por experimento. Lo que demuestra la efectividad de la protegrina al conferir tolerancia al tabaco por la infección bacteriana de *C. michiganensis*.

Estos resultados abren otra posibilidad en la aplicación de la transformación de cloroplastos con la protegrina-1 ya que es posible proporcionarle resistencia a un cultivo al producir péptidos antimicrobianos y con esto reducir las pérdidas de cosechas por enfermedades como el cáncer del tomate que afecta a las regiones productoras de tomate del país.

---

# **VII. CONCLUSIONES**

---

## VII. CONCLUSIONES

1. La transformación transitoria de tabaco con vectores virales de plantas (magnICON), permite obtener de manera rápida el péptido de origen porcino Protegrina-1 (PG-1), biológicamente activo, el cual es eficiente para inhibir el crecimiento en ensayos *in vitro* a los patógenos *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Mycobacterium bovis* BCG.
2. La transformación de cloroplastos con vectores de recombinación homóloga con el gen de la protegrina-1, produce tabacos transplastómicos que expresan de manera estable la PG-1, que es efectiva para controlar el crecimiento *in vitro* de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que son patógenos de humano, así como contra *Clavibacter michiganensis* el cual es un patógeno de plantas.
3. Plantas transplastómicas de tabaco que expresan la protegrina-1, toleran mejor la infección de la bacteria *Clavibacter michiganensis* que las plantas silvestres, lo que indica su funcionalidad como péptido antimicrobiano *in vivo*.
4. El uso de plantas como bioreactores para producción de péptidos antimicrobianos bioactivos es una alternativa viable a ser escalable a nivel industrial.



---

# **VIII.**

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, M. T., Wang, W., Shamova, O., Lehrer, R., Schiller, L., (2002). Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir Res.* **3**:1-18.
- Álvarez, M.L., Cardineau, G.A. (2010). Prevention of bubonic and pneumonic plague using plant-derived vaccines. *Biotechnol Adv.* **28**: 184-196.
- Aumelas, A., Mangoni, C., Roumestand, L., Chiche, E., Despaux, G., Grassy, B., Calas, Chavanieu, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem.* **237**:575-583.
- Barrett, J. (1975). Preparation of a bacterial vaccine. En: Goodman RN (Ed.) *Proc. First. Workshop on Phytobacteriology*. University of Missouri. 1-7.
- Bellm, L., Lehrer, R. I., Ganz, T. (2000). Protegrins: new antibiotics of mammalian origin. *Ingenta.* **9**:1731-1742.
- Birnboim, H. C, Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6):1513–1523.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immun.* **13**:61-92.
- Bradford, M. M. (1968). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu Biochem.* **72**: 248-254.
- Bruno, R. S., Eduardo, S., Rogelio, H. P., Victor, T. (2006). Péptido antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de Mex.* **48**:62-71.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Ed ASPB*. Rockville, Maryland. 37-45.
- Charp, P. A., Rice, W. G., Raynor, R. L., Reimund, E., Kinkade, J. M., Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I., Kuo, J. F. (1998). Inhibition of protein kinase C by defensines, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* **37**: 951-956.
- Chen, J., Falla, T. J., Liu, H., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Mosca, D. A., Embree, J. R., Loury, D. J., Radel, P. A., Chang, C., Gu, L., Fiddes, J. C. (2000). Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Peptide Sci.* **55**: 88-98.
- Cho, Y., Turner, J. S., Dinh, N., Lehrer, R. I. (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect Immun.* **66**:2486-2493.

- 
- Cui, L., Veeraraghavan, N., Richter, A., Wall, K., Jansen, R.K., Leebens-Mack, J., Makalowska, I., DePamphilis C.W. (2006). ChloroplastDB: the chloroplast genome database. *Nucleic Acids Res.* **34**: 692-696.
- Daniell, H., Chebolu, S., Kumar, S., Singleton, M., Falconer, R. (2004). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine.* **4913**:1-5.
- Daniell, H., Ruiz, O., Dhingra, A. (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol.* **286**:111-137.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S. B., Miller, M., Daniell, H. (2001). Overexpression of the *Bt Cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol.* **19**: 71–74.
- De Gray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., Daniell, H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127:852-862.
- Dellaporta, S.L., Word, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep.* **1**:19-21.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R. M. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* **7**(2):152–8.
- Fleming, A. (1950). Antibiotic therapy, and introductory article. *Med Illus.* **10**:470-478.
- Fortney, K., Totten, P. A., Lehrer, R. I., Spinoal, S. M. (1998). *Haemophilus ducreyi* is susceptible to protegrin. *Antimic Agents Chemoth.* **42**:10, 2690–2693.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwing, S. S, Daher, K., Baiton, D. F. (1985). Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* **76**: 1427-1435.
- Gestal-Otero, J. J. (1997). Enfermedades infecciosas emergentes, alerta mundial, respuesta mundial. *Revista Española de Salud Pública.* **71**: 225-229.
- Giddings, G., (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Plant Biotechnol.* **12**: 450–454.
- Gleba, Y., Klimyuk ., Marillonnet, S. (2005). Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**: 2042-2048.
- Harris, E., Boynton, J. E., Gillham, N. W. (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiol Rev.* **58**:700-754.

- 
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*. 303, 209-213.
- Herrera-Díaz, A. (2005) Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Tesis de Maestría En Ciencias En Biología Molecular. San Luis Potosí, México.
- Kaiser, V., Diamond, G. (2000). Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol*. **68**:779-784.
- Kamysz, W., Okrój, M., Lukasiak, J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* **50**:461-469.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680 – 685.
- Lapeña López de Armentía, S. (1999). Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. *Bol Pediatr.* **39**: 243-247.
- Lee, S. B., Li, B., Jin, S., Daniell, H. (2011). Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol J.* **9**(1):100-15. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00538.x.
- Lehrer, R., Lichtenstein, A., Ganz, T. (1993). Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immun.* **11**:105-128.
- Li, X., Gasic, K., Cammue, B., Broekaert, W., Korban, S. S. (2003). Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta*. **218**: 226–232.
- Lopez-Brea, M., Rueda, A., Guillem, V., Arcediano, A., Yubero, A., Ribera, F., Tres, A., Cortes-Funes, H., Paz-Ares, L. (1999). Filgrastim in the treatment of high-risk febrile neutropenia: results of a multicenter randomized phase III trial *Proceedings of ASCO*. **583**.
- Maliga, P. (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol.* **21**:20-28.
- Mangoni, M. E., Aumelas, A., Charnet, P., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., Chavanieu, A. (1996). Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Lett*, **383**:93-98.
- Marillonnet S., Giritch A, Gils M., Kandzia R., Klimyuk V. y Gleba Y. (2004) *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by

- 
- recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS*. 101, 6852-6857.
- Martel J.L., Tardy F., Brisabois A., Lailier R., Coudert M., Chaslus-Dancla, E. (2000). The french antibiotic resistance monitoring programs. *Int J Antimicrob Agents*. **14**(4):275-83.
- McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M., Maliga, P. (1995). Amplification of the chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio Technology*. **13**:362-365.
- McGwire, B. S., Olson, C. L., Tack, B. F., Engman, B. M. (2003). Killing of african trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Diseases*. **188**:146–52.
- Menassa, R., Du, C., Yin, Z. Q., Ma, S., Poussier, P., Brandle, J. Jevnikar, A. M. (2007). Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid tobacco expressing human interleukin-10 in a mouse model of colitis. *Plant Biotechnol. J*. **5**: 50–59.
- Milner, S., Poindexter, B., Buja, M. Smith, E., Bick, R. (2002). Localization of human beta-defensins is normal and burns skin by fluorescence deconvolution microscopy. *Burns*. **1**:1-4.
- Miyakawa, Y., Ratnakar, P., Rao, A.G., Costello, M.L., Mathieu-Costello, O., Lehrer, R.I., (1996). *In vitro* activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun*. **64**: 926-932.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Marchetti, S. (2002). Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters*. **519**: 141-146.
- Mosca, D.A., Hurst, M.A., So, W., Viajar, V.S.C., Fujii, C.A., Falla, T.J. (2000). IB-367, a protegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimic Agent and Chemoth*. **44**:7, 1803–1808.
- Murashigie, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth using plants wastes. *Biomass*. **21**:55.
- Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Selsted, M. E., Reid, T. W. (1993). Defensins are mitogenic for epithelial cell and fibroblast. *J Cell Physiol*. **155**: 408-413.
- Nizet, V., Gallo, R. I., (2003). Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand J Infect Dis*. **35**:670-676.

- 
- Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., Catanzaro, S. (1992). Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immune*. **60**:4720-4725.
- Palmer, J.D. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu Rev Genet*. **19**: 325–354.
- Park, S. Y., Murthy, H. N., Chakrabarthy, D. (2009). Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. *Somatic Cell Genetics*. 104-108. doi: 10.1007/s11627-008-9166-6.
- Patiño-Rodríguez, O. (2007) Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Tesis de Maestría En Ciencias En Biología Molecular. San Luis Potosí, México.
- Sahl, H., Bierbaum, G. (1998). LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. **52**:41-79.
- Saitoh, H., Kiba, A., Nishihara, M., Yamamura, S., Suzuki, K., Terauchi R. (2001). Production of Antimicrobial Defensin in *Nicotiana benthamiana* with a Potato Virus X Vector. *MPMI*.**14**: 111–115.
- Sambri, V., Marangoni, A., Giacani, L., Gennaro, R., Murgia, R., Cevenini, R., Cinco, M. (2002). Comparative *in vitro* activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J Antimic Chemoth*. **50**: 895–902.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Secretaría de Salud (SS) (2010). Ley General de Salud artículos 226 y 227.
- Seung-Bum, L., Baichuan, L., Shuangxia, J., Daniell, H. (2010) Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00538.x
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. **66**: 236-248.
- Shafer, W.M., Qus, X.D., Waring, A.J., Lehrer, R.I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Nat Acad Sci. USA*. **95**:1829–1833.

- 
- Shi, J., Ganz, T. (1998). The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect Immun.* **66**: 3611–3617.
- Shinnar, A.E., Butler, K.L., Park, H.J. (2003). Minireview. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg Chemist.* **31**:425-436.
- Siegenthaler, P. A. (1998) Molecular organization of acyl lip-ids in photosynthetic membranes of higher plants. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics: Advances in Photosynthesis*, 6. Kluwer Academic Publishers, Boston, **6**: 20–144.
- Sidorov, V.A., Kasten, D., Pang, S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub, J.M., Nehra, N.S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* **19**:209-216.
- Smulders, M. J. M., Klerk, G. J. (2010). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* **63**:137-146. doi: 10.1007/s10725-010-9531-4.
- Starner, T.D., Agerberth, B., Gudmundsson, G.H., McCray, P.B. (2005). Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol.* **3**:1608-1615.
- Staub, J.M., Maliga, P. (1995). Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J.* **7**:845–848.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., Russell, D. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol.* **18**: 333–338.
- Steinberg, D.A., Hurst, M.A., Fuji, C.A., Kung, A.H.C., Ho, J.F., Cheng, F.C., Loury, D.J., Fiddes, J.C. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimic Agents Chemoth.* **41**: 1738–1742.
- Steinstraesser, L., Tippler, B., Mertens, J., Lamme, E., Homann, H.H., Lehnhardt, M., Wildner, O., Steinau, H.U., Überla, K. (2005). Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology.* **2**:1-12.
- Sytnik, E., Komarnytsky, Gleba, Y., Kuchuk, N. (2005). Transfer of transformed chloroplast from *Nicotina tabacum* to the *Lycium barbarum* plants. *Cell Biology International.* **29**:71-75.
- Tamamura, H., Murakami, T., Horiuchi, S., Sigihara, K., Otaka, A., Takada, W., Ibuka, T., Waki, M., Yamamoto, N., Fujii, N. (1995). Synthesis of protegrin-

---

related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity. *Chem Pharm Bull.* **43**:853–858.

Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell.* **7**:573-588.

Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J. Lehrer, R.I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antim Agents Chemoth.* **42**: 2206-2214.

WHO (2004). Division of Control Tropical Diseases. Intestinal parasites control the disease. <http://www.who.int/ctd/intest.htm/>

Wong , M.S., Bundy, D.A., Golden, M.A.N. (1991). The rate of ingestion of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* eggs in soil and its relationship to infection in two Childrens homes in Jamaica. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **85**:89-91.

Wu, H., Zhang, G., Ross, C.R., Blecha, F. (1999) Cathelicidin gene expression in porcine tissues: Roles in ontogeny and tissue specificity. *Infect Immun.* **67**: 439–442.

Yasin, B., Lehrer, R.I., Harwing, S.S.L., Wagari, E.A. (1996). Protegrins: structural requirements for inactivating elementary bodies of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **64**: 4863–4866.

Yoon, C., Turner, J.S., Nhu-Nguyen, D., Lehrer, R.I. (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect Immun.* **66**: 2486–2493.

Zannetti, M., Gennaro, R., Romeo, D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **347**:1-5.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature.* **415**:389-395.

Zhao, C., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1995). The structure of porcine protegrin genes. *FEBS Lett.* **368**:197-202.



---

# **IX. ANEXO I**

# Transient expression and characterization of the antimicrobial peptide protegrin-1 in *Nicotiana tabacum* for control of bacterial and fungal mammalian pathogens

Omar Patiño-Rodríguez · Benita Ortega-Berlanga · Yessica Y. Llamas-González · Mario A. Flores-Valdez · Areli Herrera-Díaz · Roberto Montes-de-Oca-Luna · Schuyler S. Korban · Ángel G. Alpuche-Solís

Received: 22 February 2013 / Accepted: 15 June 2013 / Published online: 25 June 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** Mammalian infectious diseases are widespread, and some are becoming difficult to control due to inappropriate use of antibiotics. This has contributed to incidence of bacterial strains with resistance to commonly used antibiotics. Thus, effective alternative antibiotics are essential for treatment of infectious diseases. Antimicrobial peptides are viable alternatives to address this problem. Among those, protegrin-1 (PG-1) is a broad-spectrum

antimicrobial peptide. In this study, a magnICON was used to express the PG-1 peptide in *Nicotiana tabacum*, using a transient expression system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* transfection. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot analyses of transformed *N. tabacum* were employed to detect viral replicons, 290 bp and 6.1 kb. SDS/PAGE revealed presence of a band corresponding to the molecular weight of PG-1 (2.1 kDa), which was absent in wild-type *N. tabacum*. Antimicrobial/antifungal assays of protein extracts from transiently transformed *N. tabacum* were performed, and these demonstrated that PG-1 peptide activity in these plant tissues was viable and contributed to inhibition of 53.2 % of *Klebsiella pneumoniae*, 70.2 % of *Staphylococcus aureus*, 56.6 % of *Escherichia coli*, 72 % of *Mycobacterium bovis* BCG, and 70 % of *Candida albicans* cultures. No inhibition of any of these fungal and bacterial pathogens was detected when wild-type *N. tabacum* extracts were used. Therefore, PG-1 produced in plant cells of infiltrated tobacco was active and controlled growth of several bacterial and fungal human pathogens.

O. Patiño-Rodríguez · B. Ortega-Berlanga · A. Herrera-Díaz · Á. G. Alpuche-Solís (✉)  
División de Biología Molecular, IPICYT/Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa de San José 2055, 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico  
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

Y. Y. Llamas-González · M. A. Flores-Valdez  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) A.C., Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, Mexico

**Present Address:**  
A. Herrera-Díaz  
Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Oberschleißheim-Neuherberg, Germany

R. Montes-de-Oca-Luna  
Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

S. S. Korban  
Department of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois, 310 ERML, 1201 W. Gregory Drive, Urbana, IL 61821, USA

**Keywords** magnICON · Alternative antibiotics · TMV · Tobacco · Protegrin-1

## Abbreviations

AMPs	Antimicrobial peptides
TMV	Tobacco mosaic virus
GFP	Green fluorescent protein
PG1	Protegrin-1
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
TSP	Total soluble protein
Rs-ASP2	Signal peptide of the <i>Raphanus</i> antifungal protein 2
CFU	Colony-forming unit

---

# **X. ANEXO II**

---

## X. ANEXO II. Protocolos

### 10.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo

#### 10.1.1 Medios de cultivo para plantas

El medio base que se utilizó fue el de Murashigue y Skoog (MS), 1962. Los compuestos para preparar el medio se enlistan a continuación:

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100 X (g/L)
<b>MS I</b>	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
<b>MS II</b>	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
<b>MS III</b>	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
<b>MS IV</b>	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
<b>MS V</b>	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

Los componentes se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 mL a 4°C. La mezcla V, fue almacenada a temperatura ambiente. Se preparó una mezcla de sales MS 2X concentrada, donde se agregaron 80 mL de cada una de las cinco soluciones (100X), se aforó a 4 L y se almacenó a 4°C.

En caso de contar con el medio MS premezclado en polvo, se preparó pesando 4.3 g de MS (Phytotechnology®) y se agregaron 800 mL de agua. Posteriormente se agregaron 30 g de sacarosa, los reguladores de crecimiento y las vitaminas necesarias, además de ajustar el pH a 5.7. El pH fue ajustado con

---

hidróxido de sodio 1.0 ó 0.1 N y ácido clorhídrico 1.0 ó 0.1 N y se ajustó el volumen a 1 L.

Si no se contaba con las sales MS en polvo de Phytotechnology®, se midieron 500 mL de la mezcla de sales MS 2X citada anteriormente, y se agregaron 300 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 30 g de sacarosa, los reguladores de crecimiento y las vitaminas necesarias, se ajustó el pH a 5.7 o 5.8. Finalmente se aforó a 1 L con agua desionizada. Para los medios semisólidos se añadieron 7 gramos de fitoagar ó 2.5 gramos de gelán agregándose poco a poco, y evitando que se hiciera grumos. Los medios se esterilizaron a 15 lb/pulgada<sup>2</sup> durante 15 minutos.

Cuando fue necesario, el antibiótico de selección previamente esterilizado por filtración, se añadió al medio de cultivo estéril, procurando que la temperatura del medio se encontrara alrededor de los 50°C, para evitar la formación de grumos en el medio cuando se encontraba muy frío y la inactivación del antibiótico, cuando el medio se encontraba muy caliente.

A continuación se presenta la composición de los medios de cultivo, con los reguladores de crecimiento y vitaminas del sistema vegetal empleado:

<b>Componentes</b>	<b>MS</b>	<b>MSO</b>	<b>RMOP</b>
Sales MS 2X	500mL/L	500mL/L	500mL/L
Vitaminas (1000X)	MS- 1mL	B5-1mL	RMOP-1mL
BA	-	-	1(mg/L)
ANA	-	-	0.1(mg/L)
Sacarosa (g/L)	30	30	30
pH	5.8	5.8	5.8
Agar (g/L)	7	7	8

### **10.1.2 Vitaminas para medios de cultivo**

Se prepararon vitaminas concentradas, de acuerdo a los requerimientos necesarios para cada protocolo y/o planta en particular. Las vitaminas preparadas

---

para los sistemas vegetales de *Nicotiana tabacum* (tabaco), se describen a continuación:

### Vitaminas del medio RMOP (Necesarios para *Nicotiana tabacum*)

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0

### Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C.

### 10.1.3 Preparación de antibióticos, reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes

El suministro de los reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes en los medios de cultivo para plantas, son elementos importantes en el cultivo de tejidos ya que su proporción auxinas/ citocininas dictará el tipo de tejido a formarse y el uso de antioxidantes es requerido para evitar se muera el tejido por oxidación lo cual es común al dañar el explante. Los antibióticos se utilizaron para realizar la selección de plantas transgénicas ó para la selección de bacterias que contuvieran el ADN de interés.

#### 10.1.3.1 Antibióticos

**Kanamicina:** Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20°C.

---

**Espectinomicina:** Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de dihidrocloruro de espectinomicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

**Carbenicilina:** Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de Carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

#### 10.1.3.2 Reguladores de crecimiento

**Ácido naftalenacético (ANA):** Para un stock de 1.5 mg/mL, se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1N. Se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

**Benciladenina (BA):** Para preparar un stock de 0.6 mg/mL, se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

#### 10.1.4 Preparación de medios de cultivo para bacterias

**Medio de cultivo LB:** Para preparar un litro de medio LB se pesaron 20 g de base para medio de cultivo LB, se disolvió, se aforó a 1 L con agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada<sup>2</sup> durante 15 minutos. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico. Se aforó con agua desionizada y se esterilizó de igual forma.

#### 10.1.5 Preparación de soluciones

Las soluciones empleadas en la mayoría de los experimentos se prepararon de acuerdo a las instrucciones del manual de Sambrook y col., (1989).

**TAE 50X:** 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó a un litro con agua desionizada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

**Agarosa:** Se preparó de acuerdo al porcentaje a utilizar, por ejemplo, si se desea preparar al 1% en 100 mL, se añadió un gramo de agarosa y se aforó a 100 mL

---

con TAE 1X, se calentó en microondas hasta disolver y la agarosa no utilizada, se almacenó a temperatura ambiente.

## 10.2 Soluciones Bradford para cuantificación de proteínas

**Solución A:** Para preparar la solución A se mezclaron 25 mL de etanol al 95%, 50 mL de ácido fosfórico al 85% y 87.5 mg de azul de Coomassie, se agitó hasta disolver completamente, se filtró con papel filtro y se almacenó a 4°C.

**Solución B:** La solución B se preparó mezclando 7.5 mL de etanol al 95%, 15 mL de ácido fosfórico y 15 mL de la solución A. Se aforó a 250 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C.

**Buffer salino de fosfatos (PBS):** Para preparar un litro se pesaron 1.42 g de fosfato de sodio, 408 mg de fosfato de monobásico de potasio y 5.85 g de cloruro de sodio, se disolvieron en agua desionizada estéril, se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó a un litro con agua desionizada.

## 10.3 Aislamiento y purificación de ADN

### 10.3.1 Extracción de ADN plasmídico de *E.coli*

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizaron dos metodologías, una fue utilizando el Kit QIAprep<sup>®</sup>, en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante. La otra fue el método alternativo se describe a continuación:

Miniprep método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (BD) Sambrook y col. (1989).

<b>Solución I</b>	<b>Solución II</b> (Se prepara al momento de usarla)	<b>Solución III</b>
EDTA 10mM pH 8.0	NaOH 0.2N	Acetato de Potasio 3M
Tris-HCl 25mM pH8	SDS 1%	Ácido acético glacial
Glucosa 2M		5.75mL



---

Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Enseguida se añadió 150  $\mu$ L de la solución I de Birnboim (BD) y se resuspendió la pastilla con vórtex. Inmediatamente se agregaron 300  $\mu$ L de la solución II de BD recién preparada, la muestra se agitó por inversión 5 veces, hasta observar como la solución tiende a verse ligeramente transparente. Se añadieron 225  $\mu$ L de la solución III de BD, se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y finalmente se recuperó la fase acuosa.

Cuando fue necesario al notar la fase acuosa turbia se agregó un volumen de fenol-cloroformo (50:50), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm de lo contrario se precipitó el ADN recuperando el sobrenadante y se adicionó un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500  $\mu$ L de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por un periodo de aproximadamente 10 minutos. Se agregó RNAsa (20  $\mu$ g/mL), y se incubó a 37°C por 30 minutos, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN un volumen de isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C, finalmente se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua milli "Q".

#### **10.3.4 Extracción de ADN de plantas**

**Buffer de  
extracción\***  
Tris 100 mM pH 8  
NaCl 500 mM  
EDTA 50 mM

\*Se esterilizan los componentes y se añade 2% de polivinilpirrolidona y 2% de Cetil trimetilamonio bromidío (CTAB) inmediatamente antes de usarse.

---

Para la extracción del ADN de plantas y callos se utilizó el protocolo descrito por Dellaporta (1983). Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo Eppendorf® con un pistilo de plástico y se adicionaron 480  $\mu$ L de buffer de extracción, posteriormente se adicionaron 37.5  $\mu$ L de SDS 20% y se mezcló con el pistilo. Se incubaron las muestras a 60 °C por 10 minutos mezclando ocasionalmente para evitar agregaciones en el homogenizado. Se añadieron 94  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M sobre el extracto, se mezcló invirtiendo los tubos y se incubó a 4°C por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo para realizar un lavado con 600  $\mu$ L de cloroformo, posteriormente se centrifuga a 13,000 rpm durante 5 minutos y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregan 4  $\mu$ L de RNAsa (20  $\mu$ g/mL) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación se mezcló con un volumen de isopropanol frío, y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se añadieron 400  $\mu$ L de etanol al 70%. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla al aire, se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L buffer TE1X o agua milli "Q". El ADN se almacenó a -20°C.

#### **10.4 Métodos de cuantificación de ADN**

**Espectrofotometría:** La cuantificación se realiza utilizando un espectrofotómetro (Beckman®). La muestra se prepara haciendo una dilución 1:200 con 5  $\mu$ L del ADN en 995  $\mu$ L de agua desionizada. Se utiliza una celdilla de cuarzo de 10 mm de abertura para hacer la lectura a una longitud de onda de 260 nm. El equipo ya tiene la fórmula para hacer la conversión de absorbancias a concentración de ADN en ng/ $\mu$ L tomando en cuenta el factor de dilución.

**Fluorometría:** Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo genios, empleando el kit Pico Green®. Se preparó una dilución del estándar de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198  $\mu$ L de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2  $\mu$ L de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485 nm excitación/535 nm emisión). Para la curva de

---

calibración se emplearon estándares de 1, 10 y 50 ng/μL y los datos fueron analizados en el software Magellan 4<sup>®</sup>. Este es el método más recomendado aunque más costoso que el anterior por el uso de estándares.

**Gel de calidad de ADN:** El método de gel de calidad consiste en preparar agarosa al 1% y se corren las muestras a la par de un Marcador de peso molecular de 1 kb, para observar si no hay degradación del ADN. Se pueden correr muestras de ADN en las que se conozca la concentración ó marcadores de concentración conocida y el cálculo de la concentración de ADN de nuestra muestra se hace por apreciación visual o uso de un software que relaciona pixeles con concentración, lo cual no la hace tan confiable como las anteriores, pero es muy útil cuando se desea saber si el ADN no se encuentra degradado.

### 10.5 Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los componentes para las reacciones de PCR (la mezcla maestra) se prepararon con anterioridad. Los oligonucleótidos se resuspenden a una concentración de 100 μM y se prepararon stocks a 10 μM. Los dNTPs a una concentración de 10 mM fueron preparados a partir de un stock de 100 mM, de la marca Promega.

Las reacciones de amplificación de genes mediante PCR fueron aplicadas en diferentes experimentos de este trabajo. A continuación se presentan los parámetros utilizados para la PCR.

#### Condiciones para la amplificación mediante PCR

Componentes	Identificación de plantas transgénicas ó transplastómicas	Conc. Final
Oligo F (10μM)	0.25 μL	0.3 μM
Oligo R (10μM)	0.25 μL	0.3 μM
dNTP's (10mM)	0.5 μL	0.3 mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5 μL	1 mM
Buffer 10X <i>Taq</i> DNA polimerasa*	2.5 μL	1X
<i>Taq</i> DNA polimerasa*	2.5 μL	--
H <sub>2</sub> O Milli Q	16.5 μL	--

ADN Plantas (50ng-200ng/ $\mu$ L) ó ADN plasmídico dil (~20ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	--
Volumen Final	25 $\mu$ L	--

\* *Taq* Polimerasa producida y purificada en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, alineación de oligos y amplificación. Se utilizó el equipo TouchGene<sup>®</sup> (Techne).

#### Temperaturas utilizadas en la PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento
1	94	3	<i>Desnaturalización inicial</i>
2	94	0.5	<i>Desnaturalización</i>
3	56 (Según los oligos)	0.5	<i>Alineamiento</i>
4	72	3	<i>Extensión</i>
5		30 ciclos al paso 2	
6	72	7	<i>Extensión prolongada</i>

## 10.6 Manipulación enzimática del ADN

### 10.6.1 Digestión para caracterización de clonas positivas

Para la caracterización de clonas, mediante digestión con enzimas de restricción, se utilizaron aproximadamente 2  $\mu$ g de ADN plasmídico, el buffer de reacción 10X sugerido por el fabricante, en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L, con 0.2 U de enzima de restricción. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 2 h a 37°C o a la temperatura sugerida por el fabricante.

#### 10.6.1.2 Purificación de fragmentos de ADN, a partir de un producto de digestión

Se realizaron digestiones utilizando aproximadamente de 1 a 5  $\mu$ g de ADN, con la enzima de restricción deseada en presencia del Buffer de reacción recomendado por la compañía y agua desionizada estéril en un volumen total de

50  $\mu\text{L}$  de reacción. Se incubaron las digestiones a la temperatura adecuada por espacio de 4 horas o durante toda la noche según lo sugerido por el proveedor. Posteriormente el producto de la digestión fue separado en geles de agarosa del 1-2% dependiendo del tamaño de la banda de interés, fue cortada utilizando un bisturí limpio, la cual fue observada brevemente con intensidad baja de luz UV, finalmente se utilizó el QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction kit de Qiagen, y siguiendo las instrucciones del proveedor, se purificó el ADN.

### 10.6.2 Reacciones para generar extremos romos

El procedimiento para generar extremos romos con el fragmento Klenow de la Polimerasa fue el sugerido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: aproximadamente 800 ng de ADN con extremos cohesivos 5', se agregaron a 2  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de Klenow (2 U/ $\mu\text{L}$ ) y agua desionizada estéril para 20  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción, y se incubó 20 min a 37 °C. Debido a que la enzima Klenow tienen actividad de endonucleasa para rellenar y exonucleasa para rasurar, también se usó para generar extremos romos al rasurar los extremos 3', lo cual se realizó de la misma forma que para rellenar, solo que no se usaron dNTP's para favorecer su actividad de exonucleasa.

### 10.6.3 Reacciones de ligación y purificación

Se siguieron las instrucciones del fabricante para la ligación, usando un relación molar 1:1 o 3:1 inserto-vector. Se agregó T4 DNA ligasa comercial (Promega<sup>®</sup>) y se agregó el Buffer de reacción 10X, en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  de reacción.

<b>Ejemplo de reacción común:</b>	
Inserto	x $\mu\text{L}$
Vector	y $\mu\text{L}$
10X Bufer de ligación	2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O desionizada	(17-x-y) $\mu\text{L}$
T <sub>4</sub> DNA ligasa	(1U/ $\mu\text{L}$ ) 1 $\mu\text{L}$
Volumen final	20 $\mu\text{L}$

La reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C.

---

## **10.7 Transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinantes**

### **10.7.1 Preparación de células calcio competentes**

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' ó DH5 $\alpha$  de 24 horas, crecido en caldo LB a 37 °C. De este preinóculo se tomaron 500  $\mu$ L y se añadieron a 50 mL de caldo LB, se incubó por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 7 minutos a 8,000 rpm, se descartó rápidamente el sobrenadante y se mantuvieron las bacterias en hielo todo el tiempo. La pastilla se lavó con 7.7 mL de una solución fría de cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 1.27 mL de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30  $\mu$ L.

### **10.7.2 Método de transformación mediante choque térmico**

Para realizar la transformación, las células calcio competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0  $\mu$ L del ADN a introducir en ellas, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó 40 minutos a 37°C y 150 rpm. Después, 100  $\mu$ L del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/L del antibiótico adecuado según fuera el caso.

## **10.8 Análisis por Southern blot**

Se realizó una digestión con 60 mg de ADN genómico con la enzima *Bgl*II por 12 horas, para posteriormente realizar una extracción con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitar por 30 min a -20°C, con un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M y 0.7 volúmenes de isopropanol. Después de recuperar la pastilla por centrifugación a 10,000 rpm, esta fue lavada con etanol al 80% y resuspendidas 20  $\mu$ L de agua desionizada y disueltas a 65°C.

---

Las muestras fueron separadas a 40 V en un gel de agarosa al 1%, durante aproximadamente 12 horas. El gel se incubó en HCl 0.5 M por 15 min, después en NaCl 0.6 M/NaOH 0.5 M por 45 min y posteriormente se neutralizó en Tris 0.5 M, pH 7.5/NaCl 1.5 M.

Para la transferencia se empleó una membrana de Nylon (Hybond-N+ Amercham Pharmacia Biotech) que fue equilibrada en agua y posteriormente en buffer de transferencia (SSC 6X, que se preparó a partir de SSC 20X, que contiene NaCl, 3 M; citrato de sodio, 0.3 M, pH 7.0). La transferencia se realizó durante toda la noche en la modalidad “down blot”, y para ello se colocaron sobre una superficie plana los componentes en el siguiente orden: papel absorbente de 20x20 cm (suficiente para tener una altura de 10 cm), 3 hojas de papel Whatman 3M, tiras de parafilm (que delimitan la zona de transferencia), membrana de nylon, gel, 3 hojas de papel Whatman 3M previamente embebido en SSC 10X, vidrio de 6 mm y una pesa de 500 g (Sambrook y col, 1989).

Posteriormente la membrana se lavó en SSC 6X, fue colocada sobre papel Whatman 3M y se expuso a luz UV (120, 000  $\mu$ J, en equipo Spectrolinker XL-1500 UV Crosslinker) a fin de fijar los ácidos nucleicos a la membrana. La membrana fue sellada dentro de una bolsa de plástico y almacenada a 4°C hasta que se realizó la hibridación.

Para realizar la hibridación fue necesario hacer sondas específicas dependiendo del gen que se intente identificar, se empleó el kit Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II. Se realizó una PCR cambiando los dNTPs normales por los dNTs del kit Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II, que corresponden al tubo 2 del kit. Se corroboró el marcaje de la sonda al correr un gel de calidad, la sonda marcada con los nucleótidos del kit es más pesada que el producto de PCR realizado con los dNTPs normales. Se usó como sonda aproximadamente 10  $\mu$ g del amplicón de la sonda marcada, la cual antes de su uso fue desnaturalizada con un tratamiento de 94°C por 10 minutos y después rápidamente colocada en hielo.

Dicha sonda se empleó para la hibridación de la membrana durante 12 h a 42°C en el buffer Dig Easy Hyb. Posteriormente fue lavada una vez en el buffer de

---

lavado primario (SSC 2X, SDS 0.1%) por 10 min a temperatura ambiente y dos veces con el buffer de lavado secundario (SSC 0.5 X, SDS 0.1%) por 15 min a 68°C.

Finalmente, para revelar la reacción de hibridación, la membrana se equilibró en el buffer de lavado de ácido maleico (ácido maleico 0.1 M; NaCl 0.15 M, pH 7.5; Tween 20, 0.3%) por 10 min y después en 50 mL de la solución de bloqueo (dilución 1:10 del vial 6 en buffer de ácido maleico, el cual contiene ácido maleico, 0.1 M; NaCl, 0.15 M, pH 7.5) por 30 min. Después, la membrana ahora fue incubada en 10 mL de la solución que contenía el anticuerpo (diluido 1:10,000 en solución de bloqueo) por 30 min. Posteriormente la membrana se lavó dos veces con el buffer de lavado a temperatura ambiente por 20 min, para después equilibrarla por 5 min en 10 mL de buffer de detección (Tris 0.1 M; NaCl 0.1 M, pH 9.5). La membrana se colocó en una bolsa de plástico, la cual se selló y se añadió el reactivo de detección (CSPD ready to use, 1 mL por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana), se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se retiró el líquido de la bolsa. La detección de la señal luminiscente se realizó en un fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc) por 1 h.

### **10.9 Análisis por Western blot**

Las muestras de proteína soluble total (PST) fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y posteriormente el gel se sometió a un protocolo de transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) empleando un tanque de transferencia Transblot (BIORAD®).

Para ello, se equilibraron previamente el gel, la membrana, las fibras de empaque y 2 hojas de papel 3M en el buffer de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%; SDS 0.1%) por 5 min. Posteriormente se ensambló el sistema de transferencia de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La transferencia se llevó a cabo a 4°C por dos horas a 60V. Después, la membrana fue lavada con PBST por 15 min y posteriormente bloqueada con PBST conteniendo leche descremada al 2% durante 1 h. Después de lavar con PBST por 15 min, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche y se lavó



---

nuevamente con PBST. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo o ratón (dependiendo de donde se haya hecho el primario) conjugado a peroxidasa (diluido en PBST, 1:1000) por 1 h a temperatura ambiente y fue lavada con PBST.

La detección se llevo a cabo con el sustrato para peroxidasa SuperSignal West Dura substrate (Pierce®); para ello se mezclaron 1 mL de la solución A con 1 mL de la solución B y la solución resultante se añadió a la membrana dentro de una bolsa de plástico, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se detectó la señal luminiscente en un fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc) exponiendo por 20 min.

#### **10.10 Análisis por RT-PCR**

Se aisló ARN total del material a analizar usando el método de TRIZOL (Invitrogene®) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se emplearon 500 ng de ARN total para generar cDNA con el kit Taqman reverse transcription (Applied Biosystems®). Como control de carga se empleó un fragmento de la  $\beta$ -actina que fue amplificado con los oligonucleótidos: sentido 5'-AACTGGGATGACATGGAGAA-3'/antisentido5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA-3', los cuales fueron diseñados originalmente para amplificar actina de maíz. La amplificación se realizó por un análisis de PCR.

#### **10.11 Análisis por Northern blot**

Se aisló ARN total del material a analizar usando el método de TRIZOL (Invitrogene®) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Aproximadamente 1  $\mu$ g del ARN extraído se corrió en un gel desnaturizante (gel al 1% de agarosa bajo condiciones desnaturizantes estándar), las muestras fueron separadas a 40 V durante aproximadamente 12 horas.

Después de correr el gel se realizó la transferencia, para lo cual se empleó una membrana de Nylon (Hybond-N+ Amercham Pharmacia Biotech) que fue equilibrada en agua y posteriormente en buffer de transferencia (SSC 6X, que se

---

preparó a partir de SSC 20X, que contiene NaCl 3 M; citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0). La transferencia se realizó durante toda la noche en la modalidad “down blot”, y para ello se colocaron sobre una superficie plana los componentes en el siguiente orden: papel absorbente de 20x20 cm (suficiente para tener una altura de 10 cm), 3 hojas de papel Whatman 3M, tiras de parafilm (que delimitan la zona de transferencia), membrana de nylon, gel, 3 hojas de papel Whatman 3M previamente embebido en SSC 10X, vidrio de 6 mm y una pesa de 500 g (Sambrook y col, 1989).

Posteriormente la membrana se lavó en SSC 6X, fue colocada sobre papel Whatman 3M y se expuso a luz UV (120, 000  $\mu$ J, en equipo Spectrolinker XL-1500 UV Crosslinker) a fin de fijar los ácidos nucleicos a la membrana. La membrana fue sellada dentro de una bolsa de plástico y almacenada a 4°C hasta que se realizó la hibridación.

Para la hibridación y la detección se realizó el mismo protocolo anteriormente descrito para el Southern blot.

### **10.12 Análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas solubles totales**

Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford y posteriormente analizadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon en placas de vidrio empleando un equipo de electroforesis en placa vertical Bio- Rad modelo Mini-PROTEAN® 3 System. Se preparó el gel separador al 16% y el gel concentrador al 8%. Se analizaron alícuotas de 15-20  $\mu$ L del material proteico extraído de *E. coli*, como se describió anteriormente. Las muestras se corrieron en paralelo con estándares preteñidos de peso molecular conocido.

Preparación de las soluciones empleadas:

a).- Acrilamida-bisacrilamida (30%). Se pesaron 29.4 g de acrilamida y 0.6 g de bisacrilamida usando protección de vías respiratorias y colocándose en un vaso de precipitado de 250 mL y se disolvieron en agitación constante. Una vez disueltos se aforó el volumen a 100 mL con agua desionizada.

---

b).- Tampón A. (separador). Se disolvieron 9.0855 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Posteriormente se añadieron 2 g de SDS y se ajustó a un pH de 8.8 con HCl (1:1), la solución se aforó a 50 mL con agua desionizada.

c).- Tampón B (concentrador). Se disolvieron 3.0285 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Se agregaron 2 g de SDS y se ajustó el pH a 6.8 con HCL (1:1), la solución se aforó a 50 mL con agua desionizada.

d).- Persulfato de amonio. Se pesaron 0.02 g de persulfato de amonio y se disolvieron en 50  $\mu$ L de agua desionizada, agitando en un vórtex (se prepara en el momento de su uso).

e).-Tampón de corrida (Buffer de corrida). Se añadieron 11.5307 g de glicina y 2.4228 g de Tris en un vaso de precipitado de 400 mL y se disolvieron con aproximadamente 300 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 2 mL de SDS al 20 %. La solución se aforó a 400 mL con agua desionizada.

f).- Solución solubilizadora (Buffer de carga). Se añadieron 5.7 g de SDS, 25 mg de azul de bromofenol, 25 mL de Tris 1M pH 8.0, 28.6 mL de glicerol y agua c.b.p. 100 mL. Al momento de utilizarse se adicionó 1  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol por cada mL de tampón de muestra.

Para la preparación del gel separador al 14% y el gel concentrador al 16% se tomaron las siguientes cantidades:

<b>Gel separador 16%</b>		<b>Gel concentrador 6%</b>	
Acrilamida	5.36 mL	Acrilamida	1.072 $\mu$ L
Tampón A	3.75 mL	Tampón B	1.6 $\mu$ L
Agua desionizada	0.81 mL	Agua desionizada	1.275 mL
Persulfato de amonio	75 $\mu$ L	Persulfato de amonio	48 $\mu$ L
Temed	5 $\mu$ L	Temed	5 $\mu$ L

### 10.12.1 Condiciones de electroforesis

Las proteínas a analizarse se corrieron paralelamente con los estándares preteñidos de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante empleando para el gel concentrador una corriente eléctrica de 50

---

milivolts durante 30 min y para el gel separador 100 milivolts por 2.5 h, o hasta que la marca de azul de bromofenol estuvo a una distancia aproximada de 1-2 mm del extremo inferior de la placa.

### **10.12.2 Tinción de los geles con azul de Coomasie**

Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 1 h por inmersión en una solución de azul de Coomassie al 0.5% (p/v) en alcohol isopropílico al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), con agitación suave a temperatura ambiente. La decoloración de los geles se realizó mediante cuatro pasos sucesivos de 2 h cada uno en una solución de alcohol isopropílico al 20% y ácido acético a 10% en agua desionizada, a temperatura ambiente y con agitación suave. Los geles obtenidos previamente teñidos, fueron fotografiados y se analizó el patrón de bandas con el programa LabWorks<sup>®</sup>.

## **10.15 Ensayos de actividad biológica**

### **10.15.1 Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales**

#### **Buffer de extracción de Proteínas**

Fosfato de sodio 25 mM  
Cloruro de Sodio 100 mM  
Tritón 100X 0.5%

#### **PBS**

Buffer de Fosfatos PBS pH 7.4 con  
Leupeptina 10 µg/mL

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido, se agregaron 500 µL de buffer de extracción de proteínas vegetales ó PBS con Leupeptina y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1968). Se colocaron 10 µL de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1 mL del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albumina de suero de bovino como estándar (5-20 ng/µL).

### **10.15.2 Ensayos de inhibición bacteriana en medio líquido contando unidades formadoras de colonias (UFC)**

---

Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionaron de un agar de cultivo. Con un asa fueron tomadas las colonias y se transfirieron a un tubo con 4 a 5 mL de medio LB. Tras el periodo de incubación el cultivo fue centrifugado a 8,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 5 mL de buffer salino de fosfatos (PBS) y se resuspendió la pastilla bacteriana, se repitió el lavado dos veces con PBS y finalmente se resuspendió en 5 mL de buffer salino. Las células en suspensión se ajustaron con PBS aproximadamente a una OD de 0.08-0.1 (OD 625 nm) que corresponde a la escala 0.5 de McFarland (Barrett, 1975). Se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión bacteriana y se diluyeron en 19.8 mL de PBS con el fin de ajustar la suspensión bacteriana a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Se utilizaron aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína total soluble (PTS) para realizar los ensayos antimicrobianos, los cuales se agregaron a 1 mL de la suspensión bacteriana previamente ajustada a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, la mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente a 125 rpm. Tras el periodo de incubación se realizaron diluciones seriadas de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000, para finalmente tomar 100  $\mu$ L de la dilución bacteriana y se sembró en placas de medio LB sólido y se incubó a 37°C durante por lo menos 12 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias de cada placa, se realizaron los cálculos correspondientes tomando en cuenta la dilución en cada caso y se obtuvieron los datos de UFC/mL en cada ensayo.