

Programa de Doctorado en Biotecnología

Caracterización estructural, diseño racional y producción biotecnológica de variantes de secuencia de proteínas antifúngicas de hongos

Moisés Giner-Llorca¹, Francisca Gallego², Alberto Marina², Paloma Manzanares¹, Jose F. Marcos¹

1. Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).
2. Departamento de Genómica y Proteómica, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).

INTRODUCCIÓN

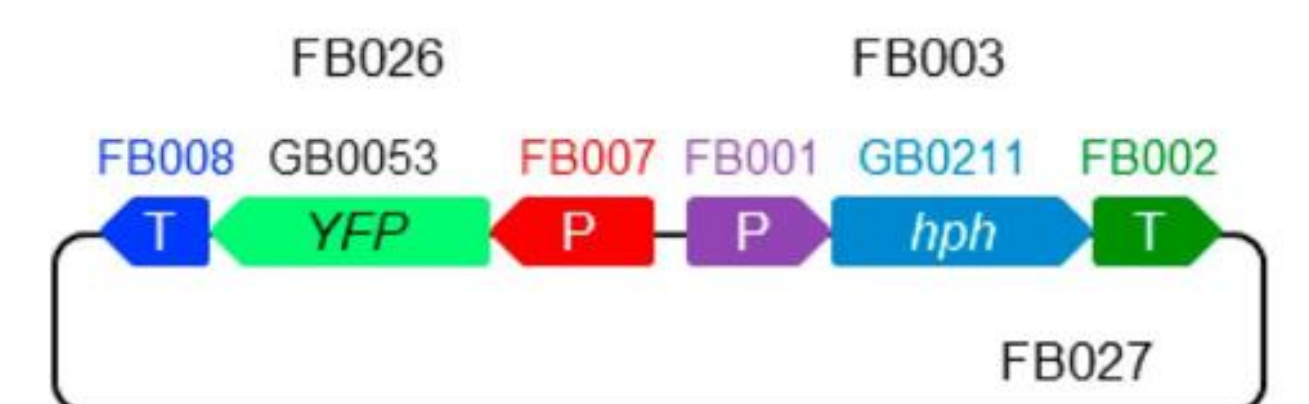
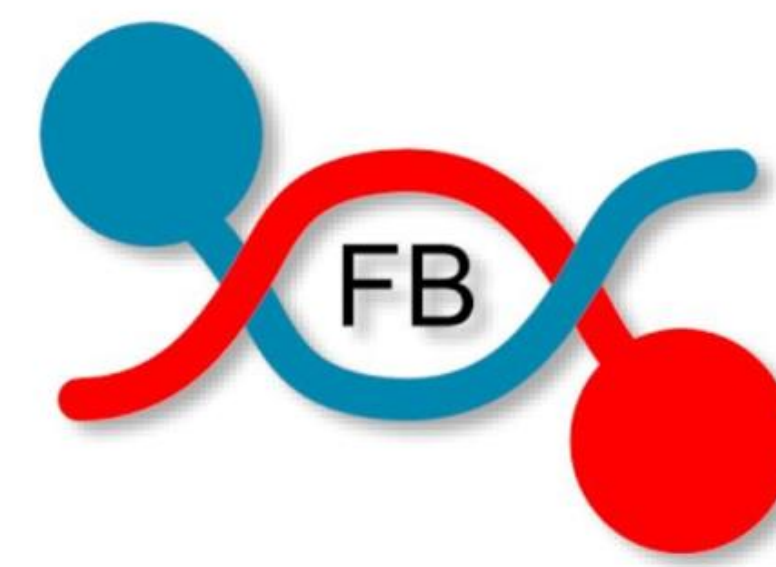
- Los **patógenos fúngicos** representan un importante riesgo para la **salud**, la **producción vegetal** y la **seguridad alimentaria**.



- Las **AFPs** son pequeñas proteínas catiónicas y ricas en cisteínas, producidas y secretadas por hongos filamentosos.
- Penicillium expansum* codifica 3 AFPs (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC) pertenecientes a clases filogenéticas A, B y C, respectivamente¹.
- PeAfpA** es la proteína más activa, **PeAfpB** presenta una actividad moderada y **PeAfpC** es la menos activa.
- El sistema de ensamblaje modular *FungalBraid*² facilita la transformación genética de hongos.

OBJETIVOS

- Caracterización estructural** de la proteína PeAfpB de *Penicillium expansum*.
- Diseño racional** de variantes de secuencia de PeAfpB.
- Producción biotecnológica** de las variantes mediante el sistema *FungalBraid*.
- Estudio de la **actividad antifúngica in vitro** de las variantes producidas.



METODOLOGÍA

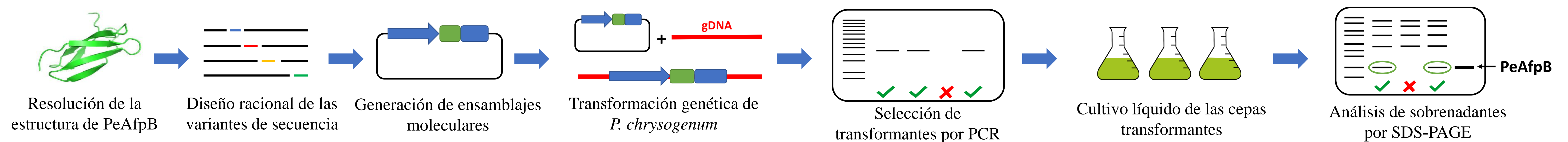


Figura 1. Esquema representativo del flujo de trabajo realizado desde la resolución de la estructura de PeAfpB hasta la producción biotecnológica de las nuevas variantes.

RESULTADOS

1. Estructura de PeAfpB y diseño racional de variantes de secuencia

Se ha resuelto la estructura 3D de PeAfpB mediante cristalografía de rayos X. La secuencia aminoacídica de PeAfpB se ha comparado con la de PAFB de *Penicillium chrysogenum*, AfpB de *Penicillium digitatum* y PeAfpA de *Penicillium expansum*. En base a la estructura obtenida y a la homología de secuencia entre estas AFPs se han diseñado 5 variantes de secuencia de PeAfpB.

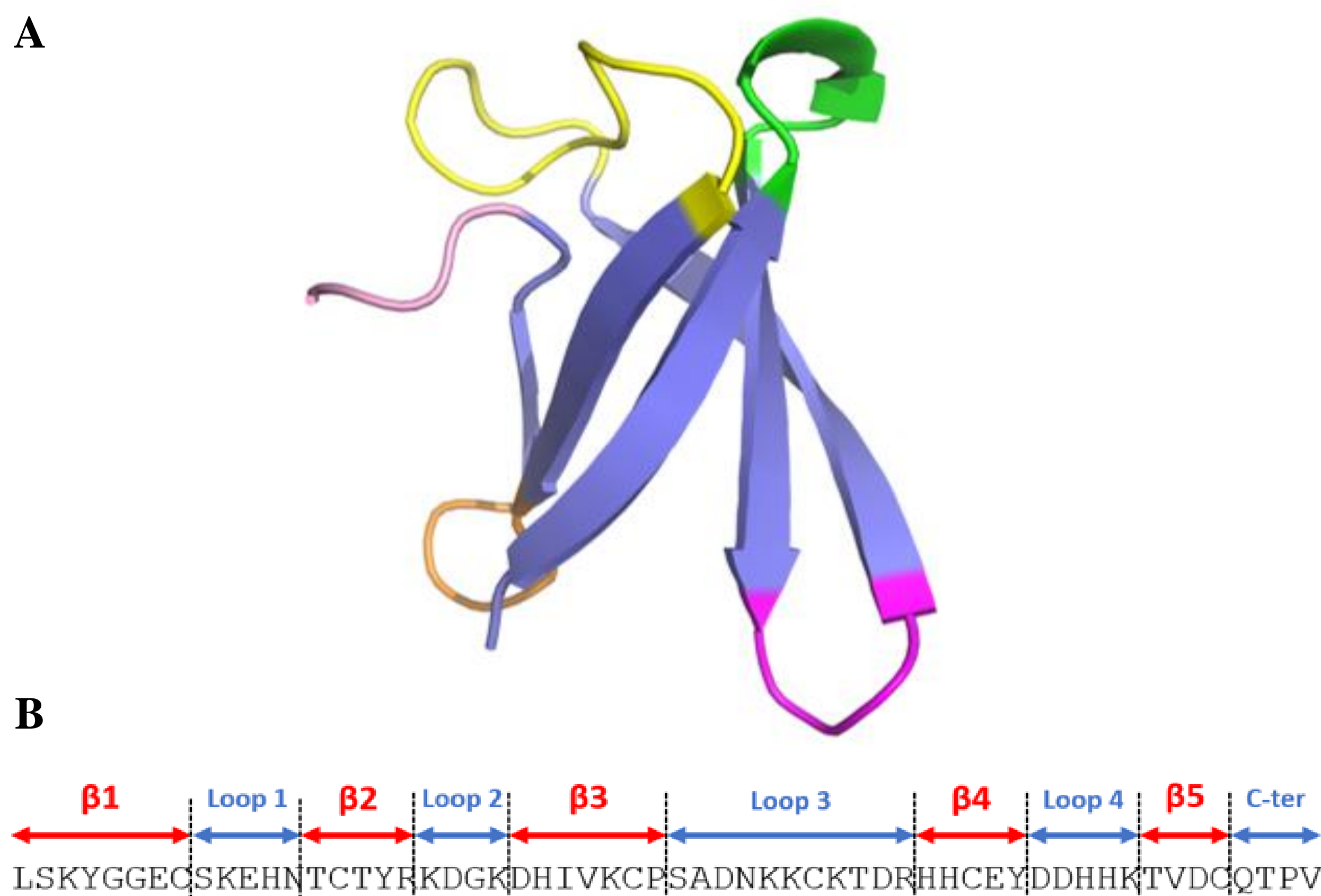


Figura 2. (A) Estructura 3D de PeAfpB. Las láminas β se representan en color azul y los loops (1, 2, 3 y 4) en verde, rosa, naranja y amarillo, respectivamente. (B) Secuencia aminoacídica de PeAfpB en la que se indica qué aminoácidos corresponden a cada motivo estructural.

2. Transformación genética y producción heteróloga

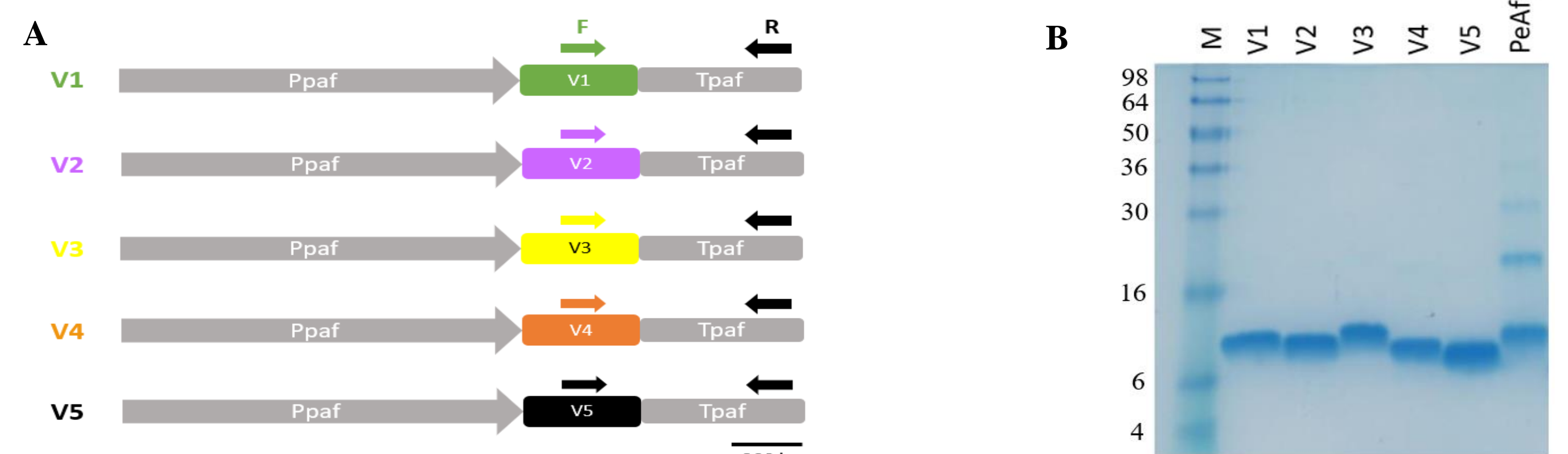


Figura 3. (A) Casetes de expresión para transformar genéticamente *P. chrysogenum* y producir de manera heteróloga las variantes. Las flechas representan los primers para la selección de transformantes. Los colores indican que para cada variante se ha utilizado un primer interno específico. (B) SDS-PAGE con las variantes purificadas y la PeAfpB nativa.

3. Caracterización antifúngica

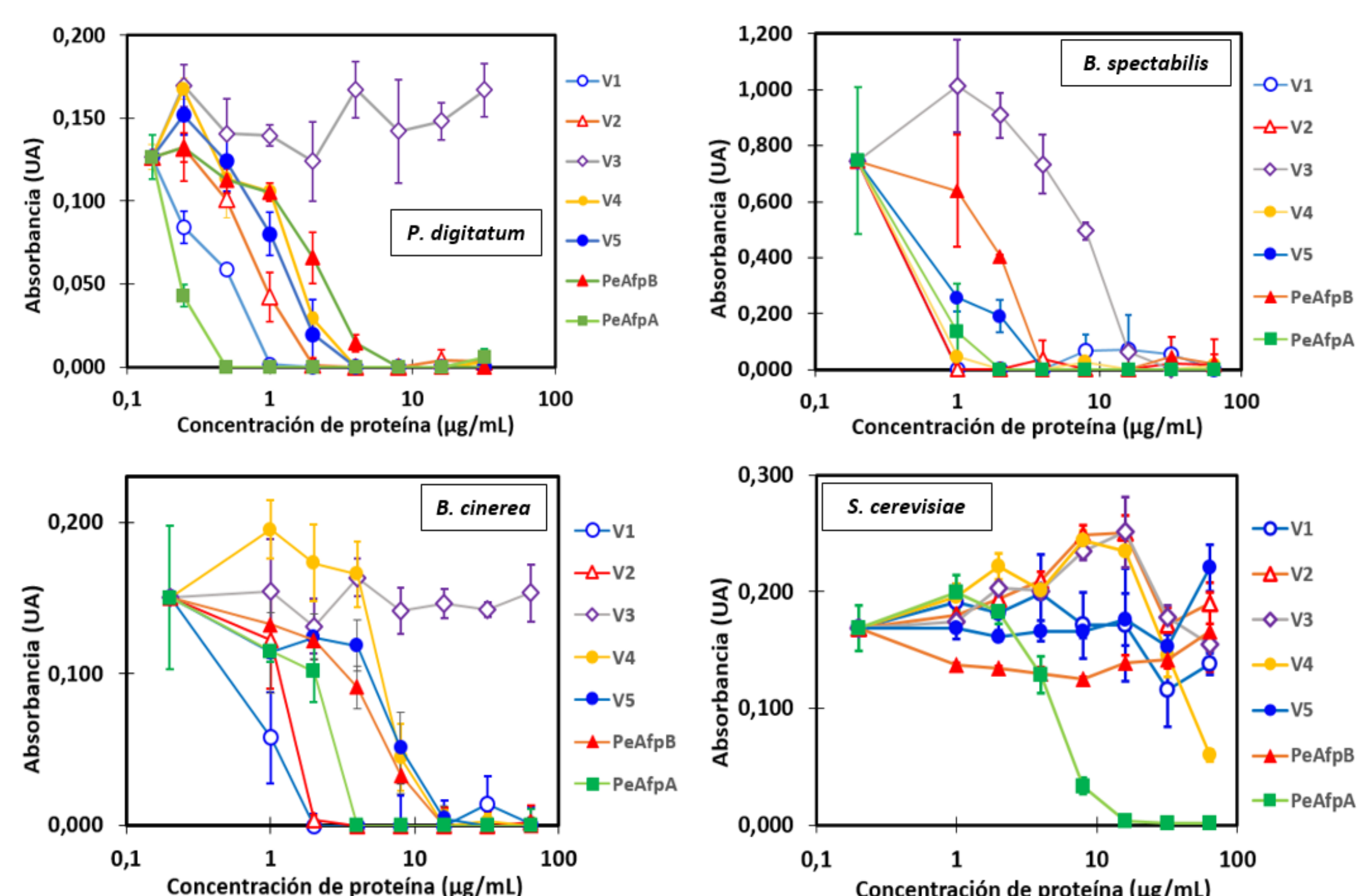


Figura 4. Ensayos de actividad antifúngica *in vitro* de las variantes de secuencia y de las proteínas nativas PeAfpA y PeAfpB frente a distintos hongos filamentosos (*Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* y *Byssoschlamys spectabilis*) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los datos representados corresponden a valores de absorbancia a 600 nm medidos tras 72h de crecimiento en PDB 5% a 25°C en placas de microtítulo. La concentración de inóculo inicial fue de $2,5 \times 10^4$ conidios/mL.

CONCLUSIONES

- Se ha resuelto la **estructura tridimensional** de la proteína antifúngica **PeAfpB** y se han diseñado **5 nuevas variantes** de secuencia.
- Las variantes se han **producido biotecnológicamente** mediante el sistema *FungalBraid* y se ha usado *Penicillium chrysogenum* como **biofactoría**.
- Frente a **hongos filamentosos**, las variantes **V1** y **V2** destacan por ser notablemente **más activas** que la PeAfpB nativa, mientras que las modificaciones introducidas en la variante **V3** provocan la **pérdida parcial o total** de su actividad. Las variantes **no presentan actividad** antifúngica frente a **levadura**.

BIBLIOGRAFÍA

- Garrigues S, Gandía M, Castillo L, Coca M, Marx F, Marcos JF and Manzanares P (2018). Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. *Frontiers in Microbiology*. 9:2370
- Hernanz-Koers M, Gandía M, Garrigues S, Manzanares P, Yenush L, Orzaez D, Marcos JF (2018). *FungalBraid*: A *GoldenBraid*-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal Genetics and Biology*. 116:51–61.