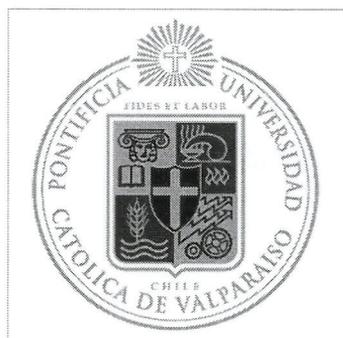


GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	22/4/05
Hora	12:50
Nº Ingreso	359

PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2002



GENERACIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS QUIMÉRICOS PARA EL CONTROL AMIGABLE DE ENFERMEDADES ASOCIADAS AL SECTOR PRODUCTIVO AGRÍCOLA CHILENO

INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto FIA BID-PI-C-2001-T-M-058

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAÍSO

Coordinador General: Sergio Marshall González

Coordinador Alterno: Gloria Arenas Díaz

Fecha de término proyecto : marzo 2004

Fecha de entrega del informe: mayo 2004

I ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del proyecto

Generación, selección y purificación biotecnológica de péptidos antimicrobianos quiméricos para el control amigable de enfermedades asociadas al sector productivo y agrícola chileno.

Código: Proyecto BID-PI-C-2001-1-M-058

Región: Quinta

Fecha de Aprobación: 16 noviembre del 2001

Forma de Ingreso al FIA: Concurso Biotecnología FIA 2001

Agente Ejecutor y Asociados: Universidad Católica de Valparaíso

Coordinador del Proyecto: Sergio Marshall González

Costo Total:

Aporte del FIA

Período de Ejecución: 26 meses (diciembre 2001-marzo 2004)

II RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto de Desarrollo e Innovación en Biotecnología 2001, tuvo como propósito la generación biotecnológica de péptidos antimicrobianos a partir de moluscos marinos a fin de que sean caracterizados y evaluado su efecto sobre patógenos asociados a recursos productivos acuícola y agrícolas chilenos. Como líneas parentales para la selección de los péptidos se utilizaron las especies *Mytilus chilensis*, *Mytilus galloprovincialis* y *Argopecten purpuratus*.

En el primer periodo comprendido entre Enero y Abril 2002 se seleccionaron secuencias que codifican para péptidos tipo defensina en *Mytilus chilensis* y *M. galloprovincialis* las que fueron utilizadas como parentales para la construcción de quimeras mediante la técnica de DNA Shuffling. Empleando partidores degenerados, diseñados a partir de una base de datos, sobre el DNA genómico de *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* y a partir de cDNA de *M. chilensis*, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas correspondientes a las moléculas parentales de defensina de ambos mitílicos. La recombinación genética inducida entre bloques de secuencias codificadoras nos permitió obtener un banco de homoquimeras y heteroquimeras de ambos mitílicos.

En el período mayo-noviembre de 2002, se obtuvo la secuencia quimérica Q-1, desde ahora Q27, la que fue caracterizada y secuenciada. La diferencia en la quimera está circunscrita a un nucleótido en fase con el ORF codificante del péptido lo que se traduce en el cambio de un aminoácido, K por R, que en el contexto total de aminoácidos de un péptido antimicrobiano, de 15 a 60 aa, puede significar una variación significativa en la funcionalidad de la molécula. En este caso aumenta su hidrofobicidad (de - 3,9 a -4,5) una de las características que potencian la interacción con las membranas bacterianas y por ende un eventual incremento en su actividad específica. La clonación de Q27 en el vector de expresión PCX TOPO de *Caulobacter crescentus*, permitió obtener la quimera como proteína de fusión asociada a un polipéptido indicador, el cual dirige la exportación del híbrido al medio de cultivo de la bacteria huésped.

En el período Diciembre de 2002 – Mayo de 2003 se determinó que este sistema de expresión no fue óptimo debido a que la proteína indicadora, RsaA, bloqueó la actividad antimicrobiana de la Q27. Por otra parte la purificación por HPLC en fase reversa, del péptido quimérico y de las líneas parentales, expresados en el sistema de *Caulobacter* arrojó concentraciones insuficientes para determinar las actividades antimicrobianas comparativas. El péptido elegido como control fue la peneidina (P3a) del camarón *Penaeus vannamei* que fue clonado en el mismo vector y sometido a las mismas condiciones de expresión en que se encuentran los clones de las líneas parentales de mitílidos así como el de la quimera Q27. A consecuencia de esto decidimos adoptar otra estrategia de expresión, reclonando los péptidos en el vector pCX libres de la proteína exportadora en *Escherichia coli*. Adicionalmente, con el fin de ampliar las posibilidades de recombinaciones, se incorporó la secuencia parental de defensina de la especie *Argopecten purpuratus*, generándose un banco de veinte nuevos clones potencialmente quiméricos, de los cuales se caracterizaron el clon 37 y el clon 40.

Durante el período, Junio-Octubre de 2003, los clones Q27, Q37 y Q40 fueron subclonados en los vectores de expresión de *E. coli* pCX que expresa el péptido al interior de las bacterias TOP, y en pET 27 b, que cuenta con una corta secuencia de exportación hacia el espacio periplásmico (pel B) de la cepa bacteriana BL 21. Además se seleccionó otro clon, Q74.

Los recombinantes debidamente purificados fueron sometidos a secuenciación para comprobar su variabilidad en relación a las líneas parentales. La estimación de las secuencias aminoacídicas determinó que Q37 y Q74 son héteroquimeras derivadas de la recombinación de las especies *Argopecten purpuratus* y *Mytillus galloprovincialis*, Q40 es una homoquimera de *Argopecten purpuratus* con mutación puntual y Q27 una homoquimera de *Mytillus galloprovincialis* también con mutación puntual.

La purificación parcial de los péptidos se logró por cromatografías de intercambio aniónico en sulfoetil sefarosa y de interacción hidrofóbica en SepPakC-18. La caracterización electroforética, indicó que las quimeras tienen pesos moleculares aparentes de 10,6 kDa, lo

que sugiere que están unidas a la secuencia señal de exportación pelB. Al evaluar su actividad antimicrobiana resultó superior a la de las líneas parentales.

Como resultado del proyecto se ha logrado expresar en *E. coli* BL 21 péptidos parentales del tipo defensina de los moluscos chilenos *Mytilus chilensis* y *Argopecten purpuratus*. Además se han generado y expresado cuatro quimeras derivadas de los parentales *Mytilus galloprovincialis* y *Argopecten purpuratus* con un amplio rango de actividad antimicrobiana superior a la de los parentales, sobre bacterias Gram + y hongos, siendo principalmente de características antifúngicas.

Por lo anterior podemos afirmar que el impacto científico del proyecto ha sido el desarrollo biotecnológico evidenciado en la capacidad de generar nuevas moléculas antimicrobianas, con secuencias nucleotídicas modificadas que pueden ser expresadas en sistemas heterólogos. Este último hecho permite estimar una producción masiva en biorreactores, que proporcionaría cantidades suficientes para su aplicación en el campo. Además las quimeras presentaron una mayor actividad sobre hongos o bacterias con respecto a las naturales, por lo que el efecto antimicrobiano se consigue con menores concentraciones y por lo tanto resultarían más eficientes frente a patógenos.

El impacto económico del proyecto surgirá cuando las moléculas descubiertas se empleen en el desarrollo de productos que llegarán a usuarios finales a través del mercado. Para que ello ocurra, será necesario evaluar las posibles aplicaciones a fin de diseñar nuevos productos, patentarlos y entregar las licencias a fabricantes que se encarguen de producirlos en forma masiva. En otros países en que grupos de investigación están desarrollando este tipo de moléculas han concitado alto interés de las empresas del sector biotecnológico, al permitirles el desarrollo de nuevos proyectos de inversión rentables. Considerando como referencia un producto de utilización en la acuicultura, que la Pontificia UCV ha licenciado a una compañía farmacéutica extranjera, se podría pensar que los péptidos generarían productos por US\$6 millones anuales, dependiendo del tamaño del mercado. El valor socio-económico de los péptidos quiméricos debiera ser elevado, si se considera que podrían solucionar problemas que actualmente requieren grandes inversiones para evitarlos, como por ejemplo en el combate de hongos en la salmonicultura que genera

pérdidas por US\$30 millones en este sector. Adicionalmente podrían ser una solución a la situación residual de antibióticos y otros elementos químicos en la carne de salmón, que actualmente está motivando rechazos de envíos en mercados internacionales, con el consecuente deterioro de la imagen país. Por tratarse de descubrimientos recientes y de una materia prima que deberá ser investigada en detalle para su uso en distintos productos, es imposible tener una evaluación precisa de su impacto económico actual. Esto se resolverá con subsiguientes evaluaciones económicas privadas que se deberán realizar para determinar los flujos y las inversiones necesarias para concebir, crear, desarrollar, producir y comercializar cada producto.

El descubrimiento de moléculas naturales con efectos antimicrobianos es una actividad intensiva en investigación científica que se ha estado promoviendo apenas en los últimos cinco años en Chile. Por esta razón, se puede indicar que este proyecto FIA se contextualiza en un proceso inicial que busca otorgar importancia a esta línea de trabajo. Los impactos inmediatos son únicamente informativos sobre las posibilidades que nos ofrecen estos péptidos, no obstante que al descubrir moléculas con actividades antibacterianas y antifúngicas concretas como sucedió con este proyecto, las expectativas que se esbozan llevan el tema a un sitio importante desde el punto de vista de la industria farmacéutica.

Se descubrieron cuatro moléculas con propiedades antimicrobianas, dos de las cuales son antifúngicas (Q-27 y Q-37) y dos adicionales con efectos antibacterianos (Q-40 y Q-74). Para materializar productos concretos, existe el próximo desafío de generar péptidos puros, establecer con precisión la diversidad de enfermedades microbianas que pueden ser abatidas con estas moléculas, diseñar y desarrollar productos para su aplicación de acuerdo a las necesidades.

Otro aspecto relevante destacar, es la necesidad de proteger la propiedad industrial de las moléculas funcionales descubiertas en este proyecto a través del patentamiento de ellas y de sus aplicaciones en productos, lo que enriquecerá el patrimonio intelectual del país en el contexto internacional.

Al culminar el proyecto se efectuó el **Primer FORO “Biotecnología Acuícola y Agrícola: del Laboratorio al Mercado”**. Se realizó en los días jueves 13 y viernes 14 de mayo en el Círculo Español de Viña del Mar. Contó con la presencia inaugural del Sr. Intendente de la V Región, don Luis Guastavino; el Rector de la Pontificia UCV y otras autoridades universitarias y del FIA. Tuvo asistencia de 66 profesionales del área biotecnológica y empresarial. Detalles del programa se presenta en el folleto adjunto. Este evento impactó en la región, debido a que el Gobierno Regional manifestó interés en geolocalizar este tema en la zona. El encuentro se caracterizó por enfatizar la posibilidad que estos descubrimientos biotecnológicos se incorporen lo más rápido posible en los mercados.

III TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta con énfasis con objetivos, justificación del proyecto , metodología , resultados e impactos esperados.

La propuesta planteó la generación biotecnológica de péptidos quiméricos a partir de péptidos antimicrobianos nativos de moluscos chilenos y la evaluación de su efecto sobre patógenos asociados a recursos productivos acuícola y agrícola chilenos. Pudiendo surgir como los antibióticos de nueva generación que influyan en el aumento de la producción agrícola y acuícola sin provocar efectos no deseados en el medio ambiente . La justificación de esta propuesta se basa en dos puntos generales 1. La necesidad de aumentar el grado de participación competitiva del país en el ámbito acuícola y agronómico a nivel internacional, manteniendo producciones sin alteraciones en el tiempo y 2. La proyección de la biotecnología como instrumento de ayuda a la autosustentabilidad futura. Por otra parte, con un enfoque más puntual, nuestra propuesta tiene un aporte biotecnológico que está sustentado en la generación de péptidos antimicrobianos quiméricos de modo que se amplíe el rango de moléculas disponibles para facilitar su manejo. Su obtención se basa en la inducción evolutiva de recombinaciones de bloques de secuencias por la técnica del “DNA shuffling”, debido a que hay prolijos estudios evolutivos sobre las defensinas animales, donde se ha demostrado que a pesar de la versatilidad de origen y funciones de éstos péptidos, conservan unidades comunes que pueden ser magnificadas biotecnológicamente. Aunque su origen está en invertebrados marinos, estas moléculas se proyectan con un gran potencial farmacológico, no solamente para la acuicultura, sino también para el control fitosanitario del área agrícola, puesto que se ha demostrado que péptidos antipatogénicos de organismos animales, muestran la misma actividad contra agentes patógenos de plantas, abriendo así interesantes perspectivas para enfrentar el problema de manejo eficiente de las enfermedades vegetales producidas por bacterias y hongos.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto

El objetivo específico que consideró la obtención de quimeras a partir de secuencias codificadoras de genes asociados a defensinas de *Mytilus chilensis* y de *Mytilus galloprovincialis* se modificó para considerar las secuencias de defensinas presentes en cualquier molusco marino para ampliar las posibilidades de obtención de heteroquimeras.

El objetivo específico que consideró la expresión de parentales y quimeras en el sistema heterólogo de *Caulobacter* se cambió a *E.coli* porque la proteína exportadora RSA inhibe la actividad antibacteriana. En este caso el péptido está asociado a pelB y Histag pero no pierde su actividad.

La purificación de los péptidos mediante cromatografía de fase reversa, HPLC tuvo la desventaja de que la recuperación de las muestras fue escasa lo que determina la poca proyección en procesos preparativos, por lo que la purificación se logró por cromatografías de intercambio aniónico en sulfoetil sefarosa y de interacción hidrofóbica en SepPakC-18.

La técnica de digestión de híbridos con la enzima S-1 reemplazó a la de caracterizar clones mediante DGGE. Esta nueva técnica permite discriminar secuencias híbridas generadas por el proceso de shuffling que se diferencian de los parentales desde un par nucleótidos. Estas diferencias se establecieron mediante hibridización molecular entre las moléculas parentales (*M. chilensis*, *M. galloprovincialis*, *A. purpuratus*) y las quimeras provenientes del proceso de recombinación.

La caracterización de los péptidos purificados por IEF seguidos de 2-D-PAGE no fue posible dado que todos ellos tuvieron un punto isoeléctrico que está fuera de los rangos de los anfolitos comerciales disponibles.

En relación a los impactos obtenidos, debemos destacar tres hechos fundamentales. Primero, la factibilidad de generar a partir de secuencias parentales que codifican péptidos inmunológicos en bivalvos marinos, péptidos híbridos con actividad antimicrobiana mejorada sin citotoxicidad. Segunda, la expresión masiva de dichos híbridos en sistemas genéticos heterólogos conservando su actividad. Tercero, el diseño de una metodología de purificación simplificada y eficiente que potencia el escalamiento comercial de estas moléculas.

3. Aspectos metodológicos del proyecto

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada
- Principales problemas metodológicos enfrentados
- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto y razones que explican las discrepancias con las metodología inicialmente propuesta
- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

GLOSARIO DE ABREVIACIONES Y SIGLAS

B5 BAC	Cepa de <i>Caulobacter crescentus</i> utilizada para propósitos de expresión.
BamHI	Enzima de restricción que reconoce y corta en el sitio de restricción BamHI, y que puede ser utilizado para generar extremos cohesivos para el clonamiento de DNA. Se utiliza en conjunto con NcoI o NdeI para clonar direccionalmente el gen de interés en pET27.
BL21	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada para propósitos de expresión.
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	Programa de búsqueda para el alineamiento de secuencias, comparando una secuencia nueva (query) con secuencias similares conocidas en bases de datos
CLUSTAL	Programa de alineamiento de múltiples secuencias. Calcula el mejor match entre las secuencias seleccionadas y los ordena de tal manera de poder observar sus identidades, similitudes y diferencias.
DNA (Deoxyribonucleic acid o ácido desoxirribonucleico)	Constituye el material genético de la mayoría de los organismos. Es el material del que están formados los genes, siendo éstos secuencias que codifican para un polipéptido o un ARN funcional.
DNasa I (Desoxirribonucleasa I)	Enzima que degrada DNA en fragmentos en forma al azar variando dependiendo del cofactor utilizado (Mn o Mg). Permite generar fragmentos de DNA que pueden ser recombinados mediante DNA shuffling.
EDTA	Reactivo que puede ser utilizado entre otras aplicaciones para detener la DNasa (luego de fragmentar DNA que se va a utilizar para DNA shuffling).
Enzima o endonucleasa de restricción	Nucleasa que reconoce secuencias nucleotídicas específicas en el DNA, y que corta el DNA por ese sitio. Se utilizan en la construcción de moléculas de DNA recombinante.
FBS (Fetal Bovine Serum o suero fetal bovino)	Aporta factores de crecimiento esenciales para el crecimiento de muchas líneas celulares, entre ellas la línea celular CHSE-214.
HEPES (Hydroxyethyl Piperazineethane sulfonic acid)	Buffer utilizado en cultivo celular para mantener el pH fisiológico
MEM (Minimal Essential Medium o medio mínimo esencial)	Medio utilizado para mantener muchas líneas celulares, entre ellas la línea celular CHSE-214.
NcoI	Enzima de restricción que reconoce y corta en el sitio de restricción NcoI, y que puede ser utilizado para generar extremos cohesivos para el clonamiento de DNA. Al clonar el gen de interés en pET27, en el sitio NcoI, este queda en fase con la secuencia del péptido señal pelB.
NdeI	Enzima de restricción que reconoce y corta en el sitio de restricción NdeI, y que puede ser utilizado para generar extremos cohesivos para el clonamiento de DNA. Al clonar el gen de interés en pET27, en el sitio NdeI, se elimina la secuencia del péptido señal pelB.
ORF (Open Reading Frame o marco/fase de lectura abierto)	Trecho de nucleótidos que empieza con un codón de iniciación y que tiene una serie de codones que codifican aminoácidos, seguido de uno o más codones de terminación.
Partidor (primer)	Oligonucleótidos que hibridan con las secuencias flanqueantes del segmento a amplificar. Generalmente se utilizan dos partidores diferentes en PCR
Partidor ANT	Partidor de la hebra antisentido del DNA doble hebra.

Partidor SEN	Partidor de la hebra sentido del DNA doble hebra.
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Suero que se utiliza para mantener el agua dentro y fuera de la célula balanceado, por lo que entre otras aplicaciones se utiliza para la dilución de soluciones y lavado de células.
PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa)	Técnica que permite amplificar segmentos de DNA específicos. Consta de tres etapas: denaturación del DNA templado en cadena sencilla, alineamiento de los partidores y extensión de los partidores por la DNA polimerasa. Técnica que puede ser utilizada entre otras aplicaciones para el clonamiento de DNA.
pCX-TOPO	Vector de expresión, que utiliza el promotor fuerte e constitutivo (en <i>Caulobacter</i>) de lactosa. Presenta la posibilidad de expresar la proteína como proteína de fusión (RsaA), que dirige su exportación al medio de cultivo. Su naturaleza TOPO permite clonar producto PCR directamente, haciendo innecesario el uso de enzimas de restricción.
pET27	Vector de expresión, que utiliza el promotor fuerte e inducible de T7 RNA polimerasa. Presenta la posibilidad de transporte de la proteína al periplasma gracias a un péptido señal (pelB).
PYE (Pyruvate Yeast Extract)	Medio de propósito general para <i>Caulobacter</i> y que es usado para mantener los cultivos.
Q1, Q27, Q37, Q40 y Q74	Diferentes quimeras generadas por DNA shuffling.
Q1-RsaA: Quimera Q1	unida a proteína de fusión RsaA.
RT-PCR (Reverse Transcription PCR o PCR en transcripción reversa)	Técnica que permite generar DNA a partir de RNA. Consta de dos etapas: Síntesis de cDNA a partir del RNA y PCR. Técnica que puede ser utilizada entre otras aplicaciones para medir la expresión de un gen determinado.
SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)	Técnica de separación de proteínas por su tamaño y no por otras propiedades físicas, no siendo afectada la separación por la carga y forma de las proteínas, que es anulada gracias a la acción del SDS.
SepPak C-18	Columna para extracción en fase sólida.
Southern Blot	Técnica de transferencia del DNA a una membrana, que puede a su vez ser hibridada con una sonda específica. Técnica que puede ser utilizado entre otras aplicaciones para determinar el número de copias de un gen en un genoma determinado.
TBE (Tris Borate EDTA)	Buffer de electroforesis. Siendo la electroforesis una técnica utilizada entre otras aplicaciones para separar segmentos de DNA por su tamaño.
TOP10	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada con propósitos generales de clonamiento.
Vector de clonamiento	Vector que se utiliza sólo para conservar y amplificar un gen en forma estable.
Vector de expresión	Vector que presenta un promotor fuerte, sitio de unión a ribosoma, y que permite generar altos niveles de transcripción y traducción de las secuencias de DNA clonadas, permitiendo por lo tanto generar una gran cantidad de la proteína recombinante deseada.

ETAPA Enero - Abril de 2002

3.1 Procedimiento de obtención de parentales y construcción de quimeras

Sobre el DNA genómico de *M. galloprovincialis* y el cDNA de *M. chilensis*, con los partidores degenerados se obtuvieron productos de amplificación cuyas secuencias nucleotídicas correspondieron a las moléculas nativas de defensina de ambos mitílidos. Los partidores se diseñaron en base a las secuencias descritas para defensinas de mitílidos. Para de amplificación en el termociclador se empleo el programa detallado en la tabla I.

Tabla I. Programa de amplificación por PCR para el termociclador Perkin Elmer Cetus “DNA Thermal Cyclor 480”

Temperatura(° C)	Tiempo	Ciclos	Objetivos	Número de programas en ciclador
95	10 min	1	Denaturación	19
95	30 seg	3	Apareamiento de baja estrictez.	20
49	15			
72	5			
95	15 seg	34	Apareamiento de alta estrictez.	21
57	15			
72	5			
72	4 min	1	Extensión final	22
10	99 hrs	permanente		23

Cuando fue pertinente, se incluyó un paso de incubación a 60 °C durante 90 min, para favorecer la adición de una adenina en los extremos 3' de las moléculas.

Las condiciones de la reacción de amplificación más usualmente empleadas fueron:

DNA genómico	25-50 ng/reacción
Tampón PE x10 tipo I	1/10 volumen
dNTPs 10mM	0,8mM
MgCl ₂ 25mM	2mM final
Partidores 10µM	0,5µM c/u
<i>Taq</i> DNA pol	0,025 U/µL
Agua para un volumen final de 12,5 µL	

Las moléculas nativas o parentales del cDNA de *M. chilensis* y la genómica de *M. galloprovincialis* (1µg de cada uno) previamente desnaturalizadas con calor, se sometieron a una pre incubación por 3 min a 37° C y luego a digestión con DNAsa I (5U) durante 20 min a 37° C en tampón Tris 50mM (pH5,5); MgCl₂ 5mM; BSA 50µg/ mL, condiciones que favorecen el corte sobre DNA de hebra simple y con un nivel de actividad enzimática de un 3% del óptimo, a fin de generar un número reducido de cortes. La reacción se detuvo por enfriamiento y adición de un exceso de EDTA (10 µL de EDTA 0,5M) y luego se extrajo con fenol:cloroformo seguido de precipitación alcohólica. Con este material se procedió a realizar dos experimentos paralelos de Shuffling a fin de generar recombinantes quimeras.

3.1.1 Experimento 1

El DNA digerido con DNAsa I, se sometió a ligación con RNA-ligasa de T4, enzima capaz de ligar moléculas de hebra simple. Se realizaron tres mezclas de ligación: 1) sólo DNA de *M. chilensis*; 2) sólo DNA de *M. galloprovincialis* y 3) mezcla 1:1 de DNA de *M. chilensis* - *M. galloprovincialis*. Las mezclas se incubaron por 2,5 horas a 37° C y después se emplearon como sustrato (en una concentración aproximada de 30 ng/µL) para amplificación por PCR empleando los partidores habituales SEN C y ANT A2, que definen los extremos de la secuencia de DNA correspondientes al péptido maduro. Con esta condición, sólo aquellos productos de ligamiento que se hayan generado y que lleven las regiones de asentamiento de los partidores a una distancia equivalente a la de las moléculas nativas, serán posteriormente seleccionadas a favor. Los productos de una primera amplificación fueron seleccionados por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, empleando como control de tamaño el DNA parental de *M. chilensis* y de *M. galloprovincialis*. Para ello, se cortó desde el gel de agarosa la región que lleva DNA de un tamaño similar al control y se purificó por columnas. Este DNA fue empleado para montar reacciones de ligación con el vector pCR II TOPO de Invitrogen para productos de PCR. Una porción de la mezcla de ligación se utilizó para transformar células quimio competentes de *E. coli* TOP 10. Los clones obtenidos fueron replicados en placas de medio LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y luego analizados mediante amplificación por PCR empleando los partidores SEN C y ANT A2.

Los productos de amplificación de los diversos clones obtenidos para las tres mezclas de ligamiento realizadas, fueron analizadas y seleccionadas por su migración electroforética en gel de agarosa al 2,5% (figura 3).

En vista que el poder resolutivo de los geles de agarosa es limitado, se procedió a un nuevo paso de selección de los clones. Para ello, una muestra del producto de amplificación por PCR de cada clon se sometió a electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 8 %. La siguiente etapa de caracterización de las secuencias quimeras se hizo mediante digestión enzimática con nucleasa S1 de híbridos entre las diferentes homo y hetero quimeras y los parentales correspondientes.

3.1.2 Experimento 2

En esta ocasión, sobre ambos DNAs parentales se realizaron amplificaciones por PCR empleando el DNA digerido con DNAsa I como partidor para la reacción de la *Taq* DNA polimerasa. Así, el molde sobre el cual se realizó la amplificación, definió el tamaño de los productos obtenidos. El uso como partidores de los fragmentos de la digestión con DNAsa I generó la variabilidad interna de las moléculas. Variabilidad que fue incrementada al realizar amplificaciones directas y cruzadas entre el DNA molde de un parental y el empleo de “partidores” provenientes de la digestión del DNA del otro parental.

Se realizaron dos rondas de amplificación para cada uno de los casos (Mch-Mch_p; Mch-Mg_p; Mg-Mg_p y Mg-Mch_p, Mch es *M. chilensis* y Mg es *M. galloprovincialis*, “p” indica que se empleó como partidor el DNA de ese parental). Como en el experimento anterior, el DNA producto de ambas amplificaciones se mezcló y purificó por columna para productos de PCR. Una porción de cada tipo, se empleó para montar reacciones de ligamiento con el vector para productos de PCR pCR II TOPO y la posterior transformación de *E. coli*.

3.2 Caracterización de clones quimera mediante digestión con Nucleasa S1.

Tanto las moléculas parentales como las quimeras seleccionadas previamente por electroforesis, se sometieron a desnaturalización térmica y enfriamiento violento a fin de obtener moléculas monocatenarias. Estas fueron mezcladas en frío en proporciones equivalentes en diversas combinaciones con respecto a las parentales. Estas combinaciones dirigidas, se sometieron a un proceso de reasociación por calentamiento y enfriamiento gradual, seguido por una incubación a 37° C a fin de consolidar la formación de híbridos. A continuación, estos híbridos fueron sometidos a digestión con la Nucleasa S1. Esta enzima que reconoce y corta DNA de hebra simple, permitió cortar aquellos puntos, incluso a nivel de un nucleótido, o regiones de longitud variable donde existía incomplementariedad de bases y por lo tanto DNA de hebra simple. La incubación de los híbridos en un tampón a pH 4,5 que incluye sales de sodio y zinc, se realizó a temperaturas entre 37° y 65°C. Dentro de este rango, se debió establecer empíricamente aquella temperatura que permitió la existencia estable de las regiones apareadas o desapareadas dentro del híbrido. Los productos de digestión con la nucleasa se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, o nativos de poliacrilamida al 8%, teniendo como controles a híbridos entre los parentales tratados con nucleasa S1. De este modo, a mayor número de fragmentos generados a partir de cada híbrido, mayor grado de divergencia de secuencia obtenida en el o los clones quimera analizados. Posteriormente el grado real de divergencia se estableció por la secuenciación del híbrido o híbridos seleccionados.

Etapa Mayo-Noviembre de 2002

3.3 Generación de quimeras entre secuencias codificadoras de defensinas de *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis*.

Mediante digestión con S1 y reconstitución por PCR en base a tamaños selectivos.

3.3.1.1 Determinación espectrofotométrica por variación de valores de absorbancia a 260 nm de la reasociación de DNAs parentales.

Estas mediciones permitieron determinar experimentalmente, la mejor temperatura para la formación estable de híbridos entre las moléculas parentales de *M. chilensis* (Mch) y *M. galloprovincialis* (Mg), que presenten el apareamiento más eficiente o con el menor número de bases mal apareadas para **homohíbridos** (reasociación de la doble hebra parental de cada tipo) o bien para **heterohíbridos** (reasociación entre moléculas de hebra simple de ambos tipos parentales mezclados). Esto permitió determinar las eventuales moléculas **quiméricas** resultantes del DNA shuffling, dado que de existir éstas, se formarían “burbujas” (o regiones sin apareamiento) sólo en aquellas regiones del híbrido en que existan diferencias de secuencia cuando se hibridan con las líneas parentales.

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda EZ 201, con circulación continua de agua en la cubeta, y los datos resultantes se registraron ya normalizados con el programa PESSW 1.2.

La capacidad resolutive del espectrofotómetro fue determinada por la lectura de una muestra de 500 ng DNA de Mch disuelto en agua. Se establecieron los valores de Absorbancia antes y después de la desnaturalización por calentamiento de la muestra a 100 °C durante 6 minutos seguidos de un brusco enfriamiento en hielo:

- Absorbancia inicial (previa al calentamiento) = 0,044
- Absorbancia final (posterior al calentamiento) = 0,071

Esta diferencia de valores fue considerada en el análisis de las eventuales quimeras.

El cálculo teórico de la Tm para estos DNAs se estableció aplicando la siguiente fórmula:

$$Tm = 81,5 + 16,6 \times \log M_{Na^+} + 0,41 \times (\% GC) - 0,6 \times (\% \text{ formamida}) - 600/N$$

- M, concentración molar de iones Sodio
- N, número total de bases de la molécula

Esta fórmula se aplicó bajo las siguientes condiciones:

- Concentración Molar de Sodio entre 0,01 y 0,4 Molar
- DNA cuyo contenido de GC está entre 35 y 70%
- Aplicable a híbridos de DNA-DNA

3.3.1.2 Caracterización de secuencias quiméricas por digestión con Nucleasa S-1

En genética molecular, poder determinar mutaciones de una sola base es crucial. La metodología de digestión con nucleasa S-1 permitió discriminar secuencias a nivel de nucleótidos. La enzima S-1 reconoce y corta DNA de hebra simple, tanto aquellos puntos que difieren en un nucleótido, como aquellas regiones de longitud variable, donde exista falta de complementariedad de bases. Las diferencias generadas por el proceso de shuffling se establecieron mediante hibridación molecular entre las moléculas parentales de *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* con aquellas provenientes del proceso de recombinación. De este modo, a mayor número de fragmentos generados a partir de cada híbrido, mayor grado de divergencia de secuencia obtenida en él o los clones quimera analizados.

- El DNA de *M. chilensis*, de *M. galloprovinciales* y una mezcla 1:1 de ambos, ≈ 500 ng por reacción, se resuspendió en tampón S1, se desnaturalizó por 10 min a 95° , y se enfrió inmediatamente en hielo.
- Se incubó en termociclador por 10 min, consecutivamente, a cada temperatura de 65° , 55° , 37° para apareamiento.
- Se adicionó nucleasa S1 (a una proporción de $0,67$ U/ μ L de reacción) e incubó a 37° durante 30 min, tomando alícuotas a los 5, 10, 20 y 30 min.
- Se detuvo cada reacción adicionando un exceso de EDTA ($11,1$ mM final).

Las muestras fueron luego analizadas en gel de poliacrilamida nativa al 12%, junto a un marcador de tamaño molecular, y un DNA parental control sin tratamiento.

En base a este resultado, se realizaron mediciones de efecto hipercrómico, que correspondió al aumento de la absorbancia del DNA a 260 nm, al desnaturalizarse progresivamente con el incremento de la temperatura.

3.3.1.3 Medición de la Actividad de la Nucleasa S1 sobre DNAs Parentales, sin Incubación Previa de Apareamiento.

3.3.1.3.1 DNAs sin denaturalizar.

Se resuspendió aproximadamente 1 μ g de cada DNA parental, en tampón S1.

Se adicionó Nucleasa S1 a una concentración final de $0,5$ ó $0,25$ U / μ L de reacción.

Se incubó a 37°C , y se tomó una alícuota a los 30 y 60 minutos.

Se detuvo la reacción por adición de EDTA frío a una concentración final de $22,2$ mM y posteriormente se mantuvo en hielo.

3.3.1.3.2 DNAs denaturados previo a incubación con enzima S1.

Protocolo:

- Resuspender aproximadamente 1,5 µg de cada DNA parental, o una mezcla 1:1 de los mismos en tampón S1. Cubrir con aceite mineral.
- Desnaturalizar por calentamiento a 95°C durante 10 min, y enfriar inmediatamente en hielo por >2 min.
- Adicionar Nucleasa S1 a una concentración final de 0,033 ó 0,167 U /µL de reacción.
- Incubar a 37°C, y tomar una alícuota a los 5, 10 y 20 minutos.
- Detener la reacción por adición de EDTA frío a una concentración final de 22,2 mM y posteriormente mantener en hielo.
- Resolver los productos de digestión de las etapas A y B por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%

3.3.2 Marcaje de la Sonda de Hibridización para Detección por Southern Blots

3.3.2.1 Preparación de la muestra

Protocolo:

Diluir el DNA que será marcado a una concentración de 10 ng/ul usando agua. La concentración de sal en la muestra de ácido nucleico no debe exceder los 10 mM. La enzima Hind III control de DNA esta diluida para uso 100ng/10ul.

Denaturar 100ng de la muestra de DNA (10 ul) por calentamiento por 5 minutos en un baño de agua hirviendo.

Enfriar inmediatamente el DNA en hielo por 5 minutos.

Centrifugar brevemente en una microcentrífuga para recuperar el DNA.

Agregar un volumen equivalente de reactivo de DNA marcado (10ul) al DNA enfriado mezclando suavemente.

Agregue la solución de Glutaraldehído, usando un volumen equivalente para el volumen del reactivo marcado (10ul). Mezcle a fondo.

Centrifugar brevemente en una microcentrífuga para colectar el contenido del fondo del tubo

Incubar por 10 minutos a 37°C. Cuando los ácidos nucleicos marcados tengan menos de 300 pares de bases se requiere aumentar el período de incubación a 20 minutos para producir un marcaje eficiente.

Si no es usado inmediatamente la muestra puede ser mantenida en hielo por un corto periodo (10 a 15 minutos). Las muestras marcadas pueden almacenarse en 50% de glicerol a menos 15°C o menos 30° C, hasta seis meses.

3.3.2.2 Hibridación (Southern Blot):

Protocolo

- Precalentar el buffer de hibridación a 42° C.
- Humedecer la membrana en el buffer 5xSSC (75mM Na₃Citrato, 0,75M NaCl, pH 7)
- Poner la membrana en un tubo y agregar una pequeña cantidad de buffer, tomando la precaución de que no queden burbujas de aire entre la membrana y el tubo.
- Reemplazar el buffer por el de hibridación. Se recomienda un volumen de hibridación de 0,0625-0,125 ml/cm².
- Prehibridizar en un horno de hibridación por 15 minutos a 22°C.
- Agregar la sonda marcada al buffer de prehibridización.
- Agregar la solución directamente sobre la membrana.
- Hibridizar en un horno de hibridación durante toda la noche a 42°C.
- Precalentar a 42°C un volumen apropiado de buffer de lavado.

Reemplazar el buffer de hibridación por 50 a 100 ml de buffer 5xSSC al tubo y vuelva a poner en el horno de hibridación por 5 minutos.

- Reemplazar con buffer de lavado hasta un tercio del volumen del tubo.
- Reincubar en el horno de hibridación por 20 minutos a 42 °C.
- Lavar por 10 minutos a 42° C (2x)
- .
- Remover la membrana e incubar en agitación suave por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Revelar la membrana de acuerdo a las instrucciones del kit comercial de ECL, Ltd. USA.

3.4 Caracterización de las secuencias quiméricas mediante secuenciación nucleotídica de DNA y estimación de los eventuales cambios aminoacídicos.

- Secuenciación y alineamiento fueron realizadas en el Laboratorio de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile (Sra Cecilia Figueroa)

Las predicciones se hicieron utilizando las bases de datos y los métodos de alineamiento de secuencias (CLUSTAL, Intelligenetics, Mountain View Ca. USA; ALIGN (Version 2) ; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA ; TFASTA- Wisconsin Genetic Software Package- USA) y software especializados (Sequencher - <http://www.genecodes.co>- Michigan, USA),

3.4.1 Clonaje de las secuencias quiméricas en sistema modelo

Clonamiento de la banda pura en el vector comercial pCR 2.1 de acuerdo a las instrucciones del proveedor (InVitrogen)

3.4.1.1 Diseño y construcción de iniciadores para PCR que permitan recuperar los péptidos quiméricos.

Expresar en una bacteria un péptido antimicrobiano puede constituir un problema insalvable. Sin embargo, este no ha sido el caso, dado que péptidos clonados han sido expresados tanto en levaduras (Destoumieux et al., 1999) como también en bacterias (De Bolle et al., 1995). Nuestra interpretación, fue que el mecanismo de acción propuesto para estos péptidos asegura su efecto actuando “desde fuera” más que “desde dentro”. Para evitar que esto constituya un problema de orden práctico y para prevenir la mayor actividad específica que esperamos obtener en las quimeras, se decidió producirlos en forma de proteínas de fusión, para que cuando se externalicen del sistema productor puedan ser fraccionados de la proteína madre por proteólisis dirigida. Para que los péptidos funcionen como agentes antibacterianos requieren de una estructura secundaria y terciaria bien definida, para que esto se cumpla se diseñaron partidores para PCR que contengan la o las secuencias que incorporen al final del péptido una señal de corte proteolítico o de corte químico, por ejemplo, un codón de metionina para ser escindido por bromuro de cianógeno.

Utilizando las secuencias nucleotídicas de las diferentes defensinas conocidas, evaluando sus regiones conservadas, y teniendo en cuenta la degeneración del código genético, se diseñaron los partidores funcionales para Tann (temperaturas de annealing) específicas., y se mandaron a construir a USA (In Vitrogen Life Technologies)

3.4.1.2 Expresión de los clones como proteínas de fusión en un sistema comercial de alta eficiencia (purepro *Caulobacter* expression system-invitrogen-usa)

El sistema seleccionado, de última generación, fue diseñado para la expresión eficiente, secreción y rápida purificación de proteínas recombinantes de tamaño medio a pequeño (menor de 450 aminoácidos) (Invitrogen. Catálogo 2001. Pag. 83), y su eficiencia ha sido científicamente comprobada (Bingle et al., 2000)

Caulobacter crescentus es una bacteria de fácil manejo que se encuentra en los ambientes acuáticos. Como parte de su ciclo de vida, ella secreta grandes cantidades de una proteína estructural hidrofílica conocida como RsaA (Bingle et al., 2000). El sistema de expresión comercial de BioRad, utiliza esta capacidad para formar una proteína híbrida RsaA-péptido (en este caso) para su recuperación en el medio de cultivo, a diferencia de otras bacterias exportadoras, como E. coli, que dejan el producto en el espacio periplásmico, generando una complicación adicional para su purificación. La proteína RsaA de 336 aminoácidos de largo con su péptido blanco fusionado forma agregados altamente hidratados, con un grado de pureza superior al 90%, lo que facilita su purificación simplemente filtrando el medio que la contiene por un tamiz de nylon. El agregado es fácilmente solubilizable para posterior uso y/o mayor purificación. El modelo es barato y de alta producción a diferencia de otras alternativas (Baculovirus).

Para obtener el péptido purificado se agregan a la secuencia del partidor 2 codones para metionina que luego pueden ser cortadas con bromuro de cianogeno en el péptido expresado.

3.4.1.3 Protocolo de manejo del SISTEMA DE EXPRESIÓN *Caulobacter*

- Se agregaron 10ng de pCX-TOPO a 50 ul B5 BAC (células de *Caulobacter* electrocompetentes) en una cubeta de 0.1 cm y se mezclaron suavemente.
- Posteriormente se electroporan las muestras usando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser bajo las siguientes condiciones:
- Voltaje: 2,5 kV, Capacitancia: 25 uF, Resistencia: 200 ohms y Tiempo constante de 3,6 a 4,3 msec.
- Se agregan 250 ul de medio líquido PYE a la muestra y se transfiere a un tubo de microcentrifuga
- Se incuba a 30 °C en un incubador con agitación a 225 rpm por 2 horas
- Se siembran diferentes volúmenes entre 10 y 100 ul de la muestra anterior sobre placas con medio PYE con 2 ug/ml de cloranfenicol
- Se incuba a 30°C por 2 a 3 días
- Se inocular una colonia en 5 ml de medio PYE con 2 ug/ml de cloranfenicol.
- Se incuba a 30°C en un incubador con agitación a 150-200 rpm por 16-18 hrs. (overnight)
- Se inoculan 2ml del cultivo overnight en 50 ml de medio de expresión M11
- Se incuban por 2 días a 30°C en un incubador con agitación a 80-100 rpm. Al término de este tiempo se observa un agregado proteico de color rojo.
- Se procede a la purificación de la proteína recombinante de fusión.
- El agregado se pasa por un embudo con una red como filtro. El agregado se recoge en un tubo para luego centrifugar a 3000-5000 xg y posteriormente bajar la velocidad a cero.
- Se remueve el sobrenadante, se lava el agregado con un volumen de agua destilada. Se repite dos veces el lavado y posteriormente se almacena a 4°C.
- Previamente al análisis mediante SDS PAGE el agregado correspondiente a la proteína recombinante de fusión se debe solubilizar.
- Se disuelve el agregado en un volumen de 8 M urea en 100 mM Tris-HCl, pH 8,5
- Para dispersar el agregado se aplican pulsos cortos de sonicación
- Se deja incubar por dos horas a temperatura ambiente. Agitando en un vortex cada 15 minutos la solución.

ETAPA Diciembre de 2002 – Mayo de 2003

3.5 Clonamiento de Peneidina P3a de *Penaeus vannamei* como proteína híbrida asociada a RsaA como control.

3.5.1 Obtención del clon de Peneidina: Contamos con el clon de P3a suministrado por la Dra Evelyne Bachere como producto de clonación desde DNA genómico. de *P. Vannamei*. Adicionalmente en nuestro laboratorio hemos hecho la clonación del ORF correspondiente incluyendo un código de iniciación (Metionina) y codones de término para la expresión en E.coli de la molécula recombinante.

3.5.1.1 Amplificación del clon

Por PCR regular. Utilizando los iniciadores dirigidos hacia los extremos terminales de los clones, ya disponibles en nuestro laboratorio

Por nested-PCR. Desde los clones en el vector de expresión pCX utilizando iniciadores complementarios a los sitios de inserción de las secuencias.

3.5.1.2 Construcción del clon híbrido peneidina-RsaA. Las secuencias del vector pCX contienen la secuencia RsaA en tal forma que se asocia al extremo carboxilo de la proteína híbrida a construir. En consecuencia el producto de amplificación específica de P3a - PCR fue previamente tratados con la Nucleasa S1, para remover las colas de “A” producto de la amplificación por PCR fueron expuestas en una relación molar 1:1 a la acción de la enzima Polinucleótido Ligasa del fago T4 para generar el clon recombinante. La inserción direccional correcta del clon (correspondiendo al ORF en fase de la proteína RsaA) fue realizado por amplificaciones por PCR usando la batería de primers contra el vector y el clon disponibles en nuestro laboratorio)

3.5.1.3 Expresión y recuperación de la proteína híbrida Peneidina –RsaA de Caulobacter. Se resume a continuación el protocolo estándar para la expresión del sistema comercial de Caulobacter:

- Se agregaron 10ng de pCX-TOPO a 50 ul B5 BAC (células de *Caulobacter* electrocompetentes) en una cubeta de 0.1 cm y se mezclaron suavemente.
- Posteriormente se electroporan las muestras usando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser bajo las siguientes condiciones:
 - Voltaje: 2,5 kV, Capacitancia: 25 uF, Resistencia: 200 ohms y Tiempo constante de 3,6 a 4,3 msec.
- Se agregan 250 ul de medio liquido PYE a la muestra y se transfiere a un tubo de microcentrifuga
- Se incuba a 30 °C en un incubador con agitación a 225 rpm por 2 horas
- Se siembran diferentes volúmenes entre 10 y 100 ul de la muestra anterior sobre placas con medio PYE con 2 ug/ml de cloranfenicol
- Se incuba a 30°C por 2 a 3 días
- Se inocular una colonia en 5 ml de medio PYE con 2 ug/ml de cloranfenicol.
- Se incuba a 30°C en un incubador con agitación a 150-200 rpm por 16-18 hrs. (overnight)
- Se inoculan 2ml del cultivo overnight en 50 ml de medio de expresión M11
- Se incuban por 2 días a 30°C en un incubador con agitación a 80-100 rpm. Al termino de este tiempo se observa un agregado proteico de color rojo.
- Se procede a la purificación de la proteína recombinante de fusión.
- El agregado se pasa por un embudo con una red como filtro. El agregado se recoge en un tubo para luego centrifugar a 3000-5000 xg y posteriormente bajar la velocidad a cero.
- Se remueve el sobrenadante, se lava el agregado con un volumen de agua destilada. Se repite dos veces el lavado y posteriormente se almacena a 4°C.

Previamente al análisis mediante SDS PAGE el agregado correspondiente a la proteína recombinante de fusión se debe solubilizar.

- Se disuelve el agregado en un volumen de 8 M urea en 100 mM Tris-HCl, pH 8,5
- Para dispersar el agregado se aplican pulsos cortos de sonicación
- Se deja incubar por dos horas a temperatura ambiente. Agitando en un vortex cada 15 minutos la solución.

3.6 Cuantificación del agregado recuperado. La proteína RsaA de 336 aminoácidos de largo con su péptido blanco fusionado forma agregados altamente hidratados, con un grado de pureza superior al 90%, lo que facilita su purificación simplemente filtrando el medio que la contiene por un tamiz de nylon. El agregado es fácilmente solubilizable para posterior uso y/o mayor purificación.

3.7 Ensayo de actividad antibacteriana de Peneidina-RsaA en microplacas. La actividad de los péptidos parentales peneidina P3a y de las quimeras se ensayaron analíticamente “in vitro”, durante 24 horas, contra el crecimiento de bacterias modelos *Micrococcus luteus*, y *Escherichia coli.*, además sobre *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, cepas descritas como los más abundantes patógenos de moluscos. La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó por valores de turbidez a 620 nm en un lector de microplaca (Multiskan MS).

Descarte del modelo *Caulobacter crescentus* como sistema de expresión de quimeras.

- Las quimeras no fueron exportados al medio a pesar de la presencia de la proteína indicadora RSA.
- Las quimeras híbridas con RSA fueron recuperadas gracias al anticuerpo anti-RSA
- Estas recuperadas del interior de las bacterias, no presentaron actividad anti-microbiana alguna.
- La remoción de la porción RSA de las quimeras con Bromuro de Cianógeno resultó ser un proceso oneroso y altamente tóxico.

- No se justificaba hacer primers libres de RSA dado que la recuperación de moléculas tan pequeñas sin un cebador definido era un proceso imposible por la cantidad de componentes de tamaño similar que se detectan en la gran mayoría de las bacterias.

3.8 Generación de un banco de clones quiméricos para la selección de nuevas quimeras

De 20 clones quiméricos putativos se seleccionaron al azar: 37, 40 y 74. Además se tomaron como control el clon parental de *Mytilus chilensis* y la quimera 27, seleccionada anteriormente.

Evaluación de la expresión de las quimeras por RT-PCR

Para ver si heteroquimeras putativas se expresan en el vector de expresión pCX en células de *E. coli* TOPO 10 F se realizó RT-PCR, utilizando los niveles de RNA de las heteroquimeras como medida de expresión.

3.8.1 RT-PCR

Se realizó RT-PCR, mediante el sistema ThermoScript RT-PCR (GIBCO/BRL), a partir de RNA de heteroquimeras putativas, extraído mediante método de reactivo trizol (GIBCO/BRL). RT-PCR fue realizado mediante el uso de primers específicos: Primer sentido **ATgATggggTTCgggTgTCCAAAC** y Primer antisentido **TCATCACCgCATCTATAgCATgTg**.

RT-PCR permitió una amplificación observable de los clones seleccionados, además de los controles, del tamaño esperado aprox. 120 pb.

3.8.2 RT-PCR 27, 37, 40 y 74

Se realizó RT-PCR de los clones para obtener la cantidad necesaria para la purificación y secuenciación, además de ver reproducibilidad del amplificado.

3.8.3 Nested PCR 27, 37, 40 y 74

Nested PCR: Es una reamplificación por PCR del producto PCR obtenido de la primera amplificación PCR (Ver metodología de PCR descrita con anterioridad). La lógica detrás de esta estrategia es que si un DNA equivocado fue amplificado por error, la probabilidad es menor de que este fuera amplificado por segunda vez también.

Se realizó una reamplificación por PCR, a partir del primer amplificado obtenido por RT-PCR de los clones, para descartar artefactos.

Se obtuvo el mismo amplificado con RT-PCR y Nested PCR lo que permitió descartar artefactos.

3.8.4 RT-PCR control DNasa

Se realizó una digestión con DNasa I (Roche) del RNA de heteroquimeras putativas, antes de RT-PCR y luego se comparó RT-PCR con y sin transcriptasa inversa, para ver que proporción del amplificado obtenido correspondía a DNA presente antes de RT-PCR y cuanto correspondía a cDNA (a partir de RNA) obtenido de RT-PCR.

El RT-PCR, a partir de RNA digerido con Dnasa I, con transcriptasa inversa presenta un amplificado mayor al de sin transcriptasa inversa lo que permite sugerir que habría expresión de los clones quiméricos.

3.8.5 Secuenciación de las quimeras

Se realizó una purificación del reamplificado, mediante columnas Quiagen, y se observó la pureza y recuperación del DNA. Posteriormente, se envió a secuenciar las dos heteroquimeras putativas.

ETAPA Junio - Octubre de 2003

3.9 Obtención de Quimeras Q27, Q37, Q40 y Q74

Las quimeras expresadas en pCX fueron reamplificadas mediante RT-PCR, este producto fue amplificado utilizando los nuevos partidores específicos diseñados *ad hoc* SenC y AntA2 para pCX.

3.9.1 Purificación y caracterización de los clones quiméricos Q27, Q37, Q40 y Q74

Las quimeras fueron purificadas mediante el procedimiento de Miniprep y caracterizadas mediante geles de Agarosa 2%.

3.9.1.1 Ligación

Posteriormente a la purificación, las quimeras se unen al vector pCR-TOPO utilizando los extremos cohesivos de los productos PCR de los clones, debido a la adición de una adenina en los extremos 3' de los productos PCR, que ocurre normalmente luego del PCR por la Taq polimerasa. Así como las propiedades especiales de este vector, pCR-TOPO, que trae extremos cohesivos de timina "activados" compatibles con los productos PCR, permitiendo una ligación simple y rápida de 5 minutos a temperatura ambiente, sin necesidad de ligasa. Se confirma la ligación mediante Miniprep y posterior visualización en geles de Agarosa 2%.

3.9.1.2 Transformación de la cepa TOP 10 con las héteroquimeras

Se transforma en la cepa *E. coli* TOP 10. El procedimiento involucra la mezcla de ligación (Q27, Q37, Q40 y Q74 en el vector pCR-TOPO) con las bacterias TOP 10 F1 químicamente competentes. Shock térmico de 42°C para permitir la entrada de ADN a la célula. Se incuban por 1 hora a 37°C y se plaquean 100 ul en placas de medio LB-Kanamicina (30ug/ml). Se dejan overnight.

3.9.1.3 Confirmación de inserto por PCR

Se confirmó por PCR el tamaño del inserto, utilizando los primer específicos. Se visualizaron en gel de Agarosa 2% y se realizó Miniprep para purificar el plásmido.

3.9.1.4 Secuenciación

Las quimeras Q27, Q37, Q40 y Q74 obtenidas en *E. coli* TOP 10 se sometieron a secuenciación.

3.9.3 Clonamiento de secuencias codificadoras de péptidos para su expresión

Las quimeras secuenciadas fueron luego amplificadas utilizando los nuevos partidores específicos SenC-NcoI y Ant A2-BamHI para pET 27b. La razón de estos últimos es generar sitios de restricción en fase con la secuencia señal de exportación pelB.

3.9.3.1 Digestión enzimática.

Se realizó una digestión enzimática con Bam HI y Nco I (2ul c/u) utilizando como buffer de reacción el Buffer Multicore. Las muestras, Q27, Q37, Q40 y Q74, y vector pET 27b se incubaron por 2 horas a 37°C y la acción enzimática se inactiva poniendo las muestras por 10 min a 65°C. Se comprueba el tamaño de los productos en gels de Agarosa 2 %.

3.9.3.2 Desfosforilación del vector pET 27b

El vector pET 27b fue sometido inicialmente a una desfosforilación con Fosfatasa Alcalina por 1 hora a 37°C con la finalidad de evitar que los extremos del vector de vuelvan a unir, con lo cual se facilita la ligación del inserto.

3.9.3.3 Purificación y caracterización de los clones quiméricos, Q27, Q37, Q40 y Q74, y del vector pET 27b.

Las muestras de DNA de Q27, Q37, Q40 y Q74 y del vector pET 27b fueron purificadas mediante el procedimiento de Miniprep y caracterizadas mediante geles de Agarosa 2%.

3.9.3.4 Ligación a pET27b

Posteriormente a la purificación, las quimeras se unen al vector pET 27b utilizando para ello la enzima DNA ligasa T4 y el Buffer de ligación 10x . Se deja la mezcla overnight a 16°C. Siempre se debe tener en cuenta la relación vector-inserto de 1:3. Se confirma ligación mediante Miniprep y posterior visualización en geles de Agarosa 2%.

3.9.3.5 Confirmación de inserto por PCR

La misma metodología descrita en 3.9.1.3

3.9.3.6 Transformación de BL 21 con los clones Q27, Q37, Q40 y Q74

Se transformó la cepa BL 21 con el plásmido. El procedimiento involucra la mezcla de Q27, Q37, Q40 y Q74 en el vector pET 27b con las bacterias BL21 químicamente competentes. Shock térmico de 42°C para permitir la entrada de ADN a la célula. Se incuban por 1 hora a 37°C y se plaquean 100 ul en placas de medio LB-Kanamicina (30ug/ml). Se dejan overnight.

3.9.3.7 Confirmación por PCR del tamaño y dirección del inserto

Se confirma por PCR el tamaño y la dirección del inserto, utilizando los partidores específicos del antisentido y el partidor del fago T7 que se encuentra en el vector. Se visualiza por geles de Agarosa 2% y se obtienen los plásmidos recombinantes con la orientación correcta por el proceso de minipreps.

3.10 Expresión de las proteína híbridas Q27, Q37, Q40 y Q74 en BL21 y purificación parcial de defensinas de parentales y quimeras

Cepas de BL21 modificadas para la expresión de Q27, Q37, Q40 y Q74 se hicieron crecer en 15 ml de medio LB, a 37° C hasta alcanzar una absorbancia de 0,6 nm (OD 600). El cultivo se mantuvo toda la noche a 4°C. Al día siguiente se colectaron las células por centrifugación (30 seg en una microcentrífuga Eppendorf) y se resuspendieron en 100 ml de medio LB suplementado con 1% glucosa, para disminuir la expresión basal del plásmido, y 30 µg/ml Kanamicina. El cultivo se creció en agitación a 37° C por 3 horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6. En ese momento se induce la expresión del gen con 100 mM IPTG durante 3 horas en glicerol 10 gr/L (v/v).

A partir de lisados bacterianos que expresaron los parentales y las proteínas híbridas, se obtuvo un extracto ácido, en 11% ácido acético, que se llevó a cromatografías de intercambio aniónico en sulfoetil Sepharosa y de interacción hidrofóbica en SepPak C-18.

3.11 Electroforesis denaturantes en geles de Tris/tricina

Para caracterizar las muestras e identificar polipéptidos de bajo peso molecular, se llevaron a electroforesis en geles de 15% Acrilamida - Tris/tricina.

3.12 Estimación del peso molecular aparente

Se determinó el peso molecular aparente de Q27, Q37, Q40 y Q74 expresada en BL 21, que incluye la secuencia de exportación pelB.

3.13 Ensayos de actividad antimicrobiana de Q27, Q37, Q40 y Q74 expresada en BL21 en microplacas

El efecto de la quimera purificada fue determinado por el ensayo en microplacas por 24 horas, sobre bacterias Gram negativas *Vibrio alginolyticus* y *V. Angillarum*; bacterias Gram positivas *M. luteus*, *S. aureus* y *S. Epidermidis*, así como sobre los hongos *Fusarium oxysporum* y *Neurospora crassa*. Las contracciones evaluadas para los parentales y quimeras fueron las siguientes:

	Concentración ug/ul
Parental	
<i>M.ch.</i>	1,0
<i>M.g.</i>	1,0
<i>A.p.</i>	1,0
Quimeras	
Q27	1,0
Q37	1,0
Q40	1,0
Q74	1,0

3.14 Ensayos de citotoxicidad

En el ensayo se mantuvo una monocapa de células cultivadas en 24 pocillos sin antibiótico y en medio MEM a pH 7.2-7.5, al que se le agregó 10mM de bicarbonato de Sodio, 15 mM HEPES y 7.5 % de FBS. Luego se extrajo el MEM-FBS de los pocillos, se lavaron con PBS y las células se incubaron con la muestra. Una vez agregada cada muestra, por triplicado, se incubó por 3 horas y se utilizó como control negativo células tratadas sin la incorporación de péptidos. Una vez terminada la incubación, se lavó tres veces con PBS y se le agregó tripsina 0.1% para desprender la monocapa de la placa, luego fueron resuspendidas en PBS para evaluar la viabilidad mediante la técnica de exclusión por Trypan Blue 0.4%. El conteo de células para la determinación de viabilidad se realizó en cámara de Neubauer.

Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes;

	Concentración ug/ul
Parental	
<i>M.ch.</i>	3.0
<i>M.g.</i>	3.0
<i>A.p.</i>	3.0
Quimeras	
Q27	3.0
Q37	3.0
Q40	3.0
Q74	3.0

4.- Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas y razones que explican las discrepancias.

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron todas las actividades propuestas para alcanzar el cumplimiento de los objetivos.

	Actividad N°	Propuesta	Realizado	Discrepancia
1.	1.1 Selección de secuencias de defensinas de <i>Mytilus chilensis</i>	Aislamiento y caracterización de las secuencias nucleotídicas para defensinas de <i>M. chilensis</i>	SÍ	NO
1.	1.2	Caracterización de las secuencias peptídicas de las defensinas de <i>M. chilensis</i>		
2.	2.1 Selección de secuencia de una defensina de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	A partir de DNA genómico de <i>Mytilus galloprovincialis</i> y del diseño de cebadores a partir de la información publicada, obtener secuencia nucleotídica de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	SÍ	NO
2.	2.2 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i>	Construcción de secuencias homoquiméricas de <i>M. chilensis</i>	SÍ	NO
2.	2.3 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i> y <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Construcción de secuencias heteroquiméricas de <i>M. Chilensis</i> y <i>Mytilus galloprovincialis</i>	SÍ	NO
3.	3.1 Caracterización de la secuencia quimérica	Caracterización de la (o las) secuencia (s) quimérica (s) mediante digestión por nucleasa S1	SÍ	NO
3.	3.2	Caracterización de la secuencia quimérica mediante secuenciación nucleotídica de DNA	SÍ	NO

3	3.3	Estimación de eventuales cambios aminoacídicos de la secuencia quimera	Sí	NO
4.	4.1 Clonaje de las secuencias quiméricas	Clonaje de las secuencias quiméricas en sistema modelo	Sí	Se cambió sistema modelo de <i>Caulobacter crescentus</i> a <i>E. coli</i> BL21 con vectores de expresión incluidos
4.	4.2 Diseño de partidores para el rescate de la quimera	Secuenciación de DNA, estimación de eventuales cambios aminoacídicos.	Sí	NO
4.	4.3 Expresión de péptido quimérico	Expresión de clones como proteínas de fusión en sistema de alta eficiencia	Sí	<ul style="list-style-type: none"> ➤ En ninguno de los sistemas modelos se pudo recuperar el híbrido libre del señuelo. ➤ Los péptidos recuperados con RSA no fueron activos. ➤ Los péptidos recuperados con pelB tuvieron actividad relativa.
5.	5.1 Caracterización cromatográfica del péptido quimera	Caracterización cromatográfica en fase reversa por HPLC del péptido quimera.	Sí	Eficiencia de recuperación postHPLC baja
6.	6.1	Caracterización Electroforética de péptidos quimeras en geles bidimensionales de policrilamida y por isoelectroenfoque	Sí	El pI de los péptidos lo que impide su resolución en IEE
7.	7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antimicro-biana	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana en microplaca.	Sí	NO
7.	7.2 Evaluación de la citotoxicidad	Evaluación <i>in vitro</i> de la potencial citotoxicidad de los péptidos quimeras.	Sí	NO

7.	7.3 Selección de péptidos quiméricos más eficientes	Selección de péptidos quiméricos con la mayor productividad, rango de acción y actividad específica.	SÍ	NO
8.	8.1 Evaluación de péptidos sobre patógenos acuícolas	Evaluación de la acción de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura.	SÍ	NO

5.- Resultados por periodos

Periodo Enero-Abril 2002

Empleando los partidores descritos en la figura 1, y sobre DNA genómico de *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* y a partir de preparaciones de cDNA de *M. chilensis*, se obtuvieron productos de amplificación cuyas secuencias nucleotídicas correspondieron a las moléculas nativas de defensina de ambos mitílidos.

• <i>Péptidos</i>		
MGD1	GFGCPNNYQCHRHCKSI	PGR
MGD2	GFGCPNNYACHQHCKSI	R
ESCORPION	GFGCP	CGGYCGGWHLR
LIBÉLULA	GFGCP	CTCYR
	GFGCPNNYQCHRHCKSI	PGR
	GFGCPNNYACHQHCKSI	R
	GFGCP	CGGYCGGWHLR
	GFGCP	CTCYR
• <i>Oligonucleótidos</i>		
SEN-A	GFGCPNNY	cGGTTGGHTGYCCHAAYAAYTA
SEN-B	GFGCPN	cTGCTGGSTTYGGHTGYCCHAA
SEN-C	GFGCP	cACTGCTGGNTTYGGNTGYCC
SEN-D	GFGC	cgcACTGCHGGNTTYGGNTG
<u>ANT-A</u>	cCCGCATCKATARCANGTRC	ANC RCTCYRCG
ANT-B	ccGCCRCATCKRTARCANGTRC	CTCYRCG
ANT-A1	CCGCATCKATARCANGTRC	ANC LRTCYRCG
<u>ANT-A2</u>	CCGCATCKATARCANGTRC	ANC RCTCYRCG

Figura 1. Secuencias de los péptidos obtenidas de la literatura y secuencias de los partidores degenerados diseñados para la amplificación de defensinas. En color azul y verde se indican las regiones de los péptidos maduros sobre las cuales se asientan los partidores. Los partidores resaltados en fucsia corresponden a los de mejor eficiencia de amplificación.

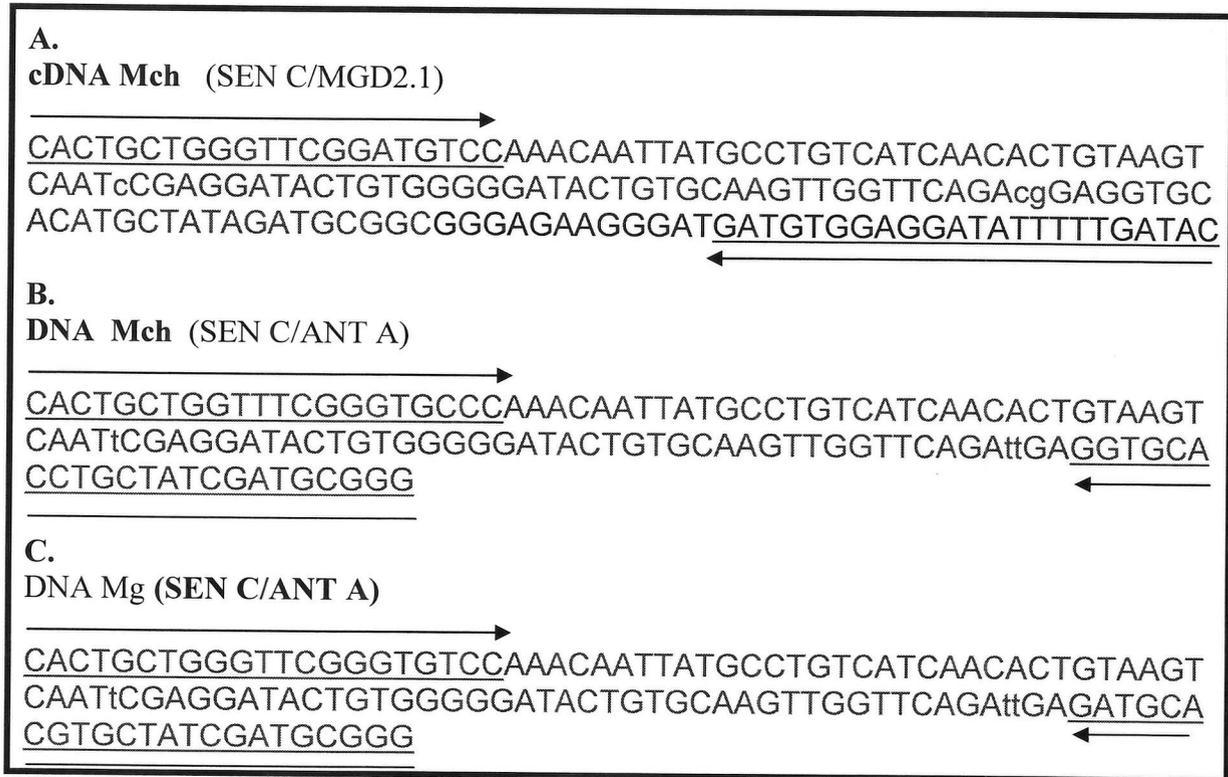


Figura 2. Secuencias nucleotídicas de productos de amplificación por PCR del: **A.** cDNA de *M. chilensis*, **B.** DNA genómico de *M. chilensis* y **C.** DNA genómico de *M. galloprovincialis*. La secuencia de los partidores empleados en cada caso (SEN C, ANT A y MGD2.1) se indican subrayadas y la flecha, la dirección del partidor. En letra verde mayúscula se indican los nucleótidos que por diseño de los partidores son variables, y en minúsculas las diferencias de secuencia entre los tres clones. Para el cDNA, en azul se indican los nucleótidos obtenidos por el asentamiento del partidor MGD2.1 (obtenido de la literatura) más hacia la región 3' del gen y que no codifican para el producto maduro, región que es removida del péptido.

El análisis comparativo de estas secuencias nucleotídicas que pertenecen a la misma familia génica Figura 2, considerando especies, permitió establecer que el mayor grado de diferencias se encontró entre el cDNA de *M. chilensis* y el DNA genómico de *M. galloprovincialis*. Además, la similitud de secuencia de ambas defensinas de *M. galloprovincialis*, hace muy posible que, mediante el procedimiento utilizado, ambas moléculas se amplifiquen a la vez desde el DNA genómico de este bivalvo, las que son visualizadas como una sola banda en geles de agarosa.

Estas consideraciones han sido el criterio para establecer que las secuencias de cDNA de *M. chilensis* y la genómica de *M. galloprovincialis* son las más adecuadas para la realización de los experimentos de shuffling intrafamiliar.

Los resultados iniciales de selección por migración electroforética en geles de agarosa al 2,5%, indican que los diversos clones obtenidos para las tres mezclas de ligamiento realizadas, tuvieron igual, mayor o menor migración en relación a los controles de DNA parental. Aquellos que fueron de mayor o menor tamaño fueron excluidos (figura 3). De esta forma, se llegó a un total de 135 clones repartidos en 52 para las homoquimeras de *M. chilensis*, y 40 para *M. galloprovincialis* y 43 para las heteroquimeras de *M. chilensis*- *M. galloprovincialis*.

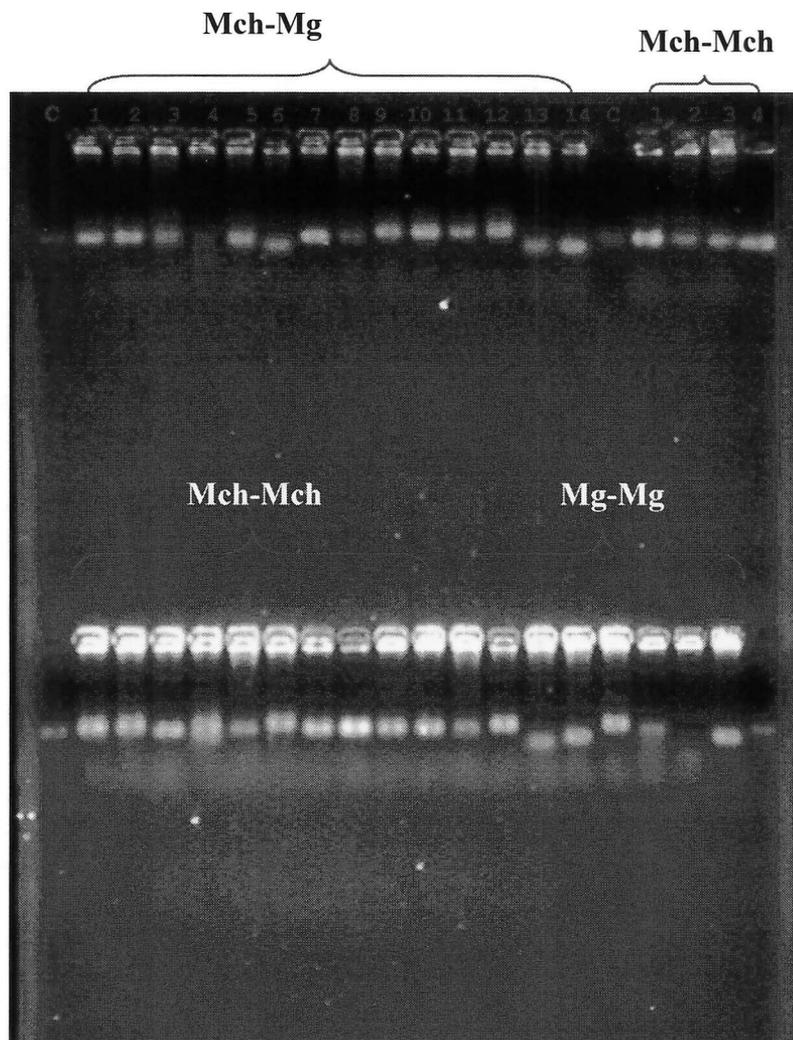


Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % para selección de clones por tamaño. **Clones heteroquimera Mch-Mg** Seleccionados: 1, 2, 3, 5, 7, 8. No seleccionados por tamaño mayor: 9, 10, 11, 12. No seleccionados por tamaño menor: 13 y 14. **Clones homoquimera Mch-Mch.** Seleccionados: 1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14. No seleccionados por tamaño mayor: 10. No seleccionados por tamaño menor: 4 y 8. **Clones homoquimera Mg-Mg.** Seleccionados: 1, 6. No seleccionados por tamaño mayor: 2 y 5. No seleccionados por tamaño menor: 3, 4 y 8. **C,** Control de producto de amplificación del cDNA de *M. chilensis*.

Sin embargo, dadas las limitaciones de los geles de agarosa, se procedió a una segunda ronda de selección mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 8%. Este sistema permite un mayor poder resolutivo, permitiendo, en consecuencia, una selección más fina de los clones. Como se muestra en las figuras 4 y 5, las electroforesis en geles de poliacrilamida permitieron descartar clones que presentaron un duplete que no fue previamente vislumbrado o que mostraban una movilidad similar a los controles en gel de agarosa. Con los clones positivamente seleccionados se trabajó en la búsqueda de las quimeras.

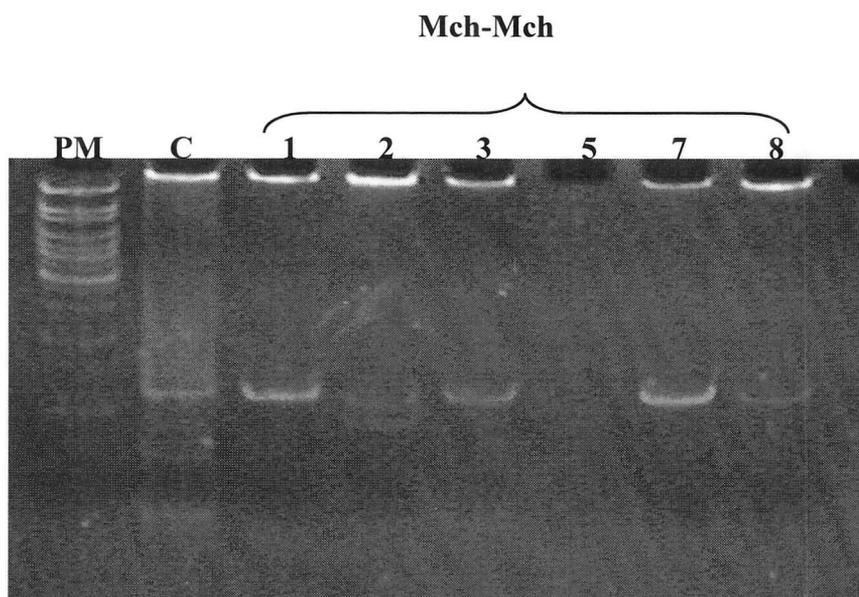


Figura 4. Electroforesis de geles nativos de poliacrilamida al 8%. Selección por tamaño de los clones de la heteroquimera Mch-Mg, previamente seleccionados en geles de agarosa 2.5%. Los clones que coinciden en tamaño con el control son 1, 3, 7 y 8. El clon 2, se descarta por presentar una segunda banda de menor tamaño. PM, escaleras de tamaños de referencia de 100 pb. Control, producto de amplificación del cDNA de *M. chilensis*.

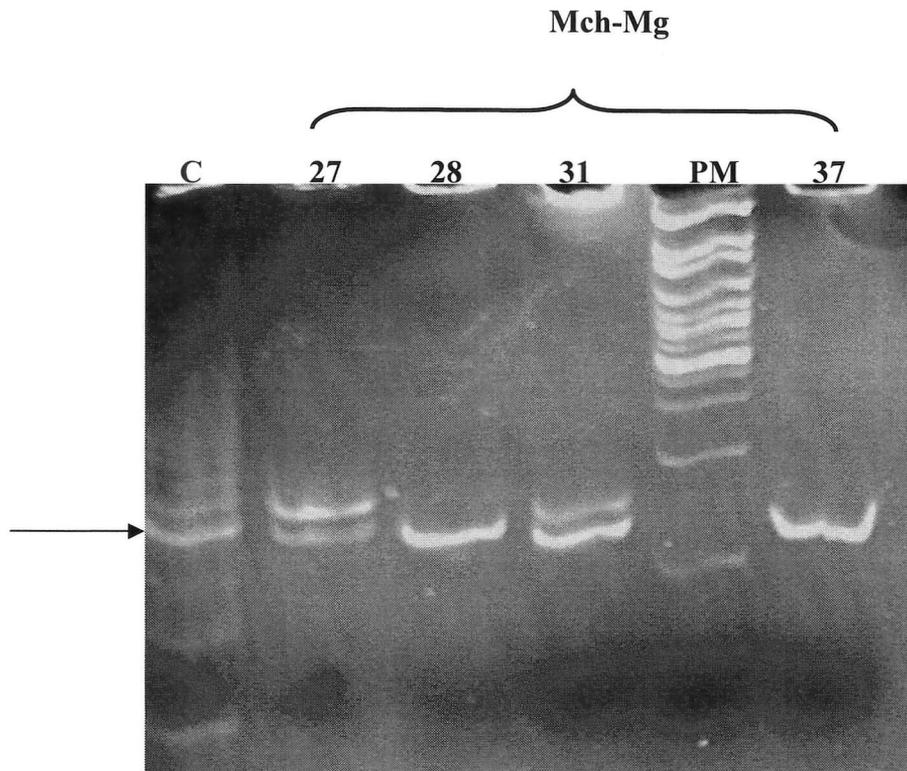


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 %. Segunda etapa de selección de clones de la heteroquimera Mch-Mg previamente seleccionados en gel de agarosa. Los clones 28 y 37 corresponden con el tamaño de la banda control. Mientras que los clones 27 y 31 presentan doble banda y fueron descartados. La flecha indica la banda de 123 pb del control. PM, escaleras de tamaños de referencia de 100 pb.

En relación a los resultados generados en el **experimento 2**, puede apreciarse que, como se indica en la figura 6, los productos de amplificación de las diferentes combinaciones rindieron tamaños muy similares o iguales a los parentales. Estos productos de PCR fueron clonados en *E. coli* y actualmente, se cuenta con una batería de clones para las diferentes combinaciones que se distribuyen de la siguiente manera: Mch-Mch_p sobre 100; Mch-Mg_p de 100 a 110; Mg-Mg_p 52 y Mg-Mch_p de 100 a 120.

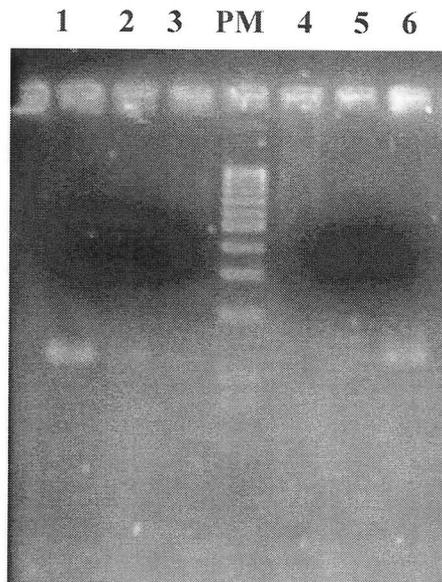


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % para productos de amplificación de experimento Shuffling 2. Carriles 1 y 6 controles de DNA de Mch y Mg parentales. Carriles 2, DNA Mch-Mch_p; 3, Mch-Mg_p; 4, Mg-Mg_p; 5, Mg-Mch_p. PM, escaleras de tamaños de referencia de 100 pb.

Periodo Mayo-Noviembre 2002

En este período se evaluó en forma exhaustiva la eficiencia del sistema *Caulobacter crescentus* como modelo de expresión de quimeras. Como se indicó, el sistema fue descartado y se cambió por el sistema de *Escherichia coli* BL21.

En forma paralela, se obtuvo la primera quimera Q27 cuya secuencia es:

Q27 GFGCPNNYACHQHCRSIRGYCGGYCASWFRLRCTCYRCG
(39aa)

Periodo Diciembre 2002 - Mayo 2003

Dado que el sistema Caulobacter fue descartado y contábamos con un gran número de extractos congelados, se procedió a su purificación escalonada hasta el nivel de cromatografía HPLC para evaluar la recuperación cuantitativa de los péptidos quiméricos y parentales y así buscar alternativas de remoción de la secuencia híbrida interferente RSA y determinar la eventual actividad antimicrobiana de los péptidos puros. Desgraciadamente la recuperación fue extremadamente baja.,

En forma paralela se generaron los clones quiméricos Q37 y Q40, cuyas secuencias son:

Q37 G F G C P N N Y A C H Q H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(39 aa)

Q40 G F G C P N E Y Q C H R H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(39 aa)

Adicionalmente, como una manera de ampliar las posibilidades de recombinación en la construcción de quimeras, se incorporó la secuencia parental de la defensina de *Argopecten purpuratus* cuya secuencia es:

Ap G F G C P N E Y Q C H R H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L R C T C Y R C G
(39 aa)

Periodo Junio - Octubre 2003

Durante este período se implementó el nuevo sistema de expresión E. coli BL 21 que introdujo las siguientes modificaciones a los clones para facilitar su expresión:

- Cambio de vector
- Introducción de secuencias señuelo
- Introducción de un codon de Metionina a las secuencias a clonar para la expresión continua con el péptido señal pelB.
- Mantención de la secuencia Histag en el extremo C Terminal de las secuencias blanco, como una eventual alternativa de purificación.

Por otra parte se seleccionó otra quimera – Q74 – resultante de la combinación entre M. galloprovincialis y A. purpuratus y cuya secuencia es:

Q74 G F G C P T N Y A C H Q H C K S I R G Y C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(39 aa)

**RESUMEN DE SECUENCIAS QUIMERICAS Y PARENTALES° EXPRESADAS
EN EL SISTEMA BL21**



PANEL A

PelB M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
(22 aa)

Q27 M G F G C P N N Y A C H Q H C R S I R G Y C G G Y C A S W F R L R C T C Y R C G
(40aa)

Q74 M G F G C P T N Y A C H Q H C K S I R G Y C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(40 aa)

Q37 M G F G C P N N Y A C H Q H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(40 aa)

Q40 M G F G C P N E Y Q C H R H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L S C T C Y R C G
(40 aa)

Ap M G F G C P N E Y Q C H R H C K S I P G R C G G Y C G G W H R L R C T C Y R C G
(40 aa)ty

Mch M G F G C P N N Y A C H Q H C K S I R G Y C G G Y C A S W F R R R C T C Y R C G
(40 aa)

Mg M G F G C P N N Y A C H Q H C K S I R G Y C G G Y C A S W F R L R C T C Y R C G
(40 aa)

Histag D E D P N S S S V D K L A A A L E I K R A S Q P E L A P E D P E D V E H H H H H
(41 aa)

PANEL B

Q27 MGF GCPNNYACHQHCRSIRGYCGGYCASWFRLRCTCYRCG
Q74 MGF GCPNTNYACHQHCKSIRGYCGGYCGGWHRLSCTCYRCG
Q37 MGF GCPNNYACHQHCKSIPGRGCGGYCGGWHRLSCTCYRCG
Q40 MGF GCPNEYQCHRHCKSIPGRGCGGYCGGWHRLSCTCYRCG
Ap MGF GCPNEYQCHRHCKSIPGRGCGGYCGGWHRLRCTCYRCG
Mch MGF GCPNNYACHQHCKSIRGYCGGYCASWFRRRCTCYRCG
Mg MGF GCPNNYACHQHCKSIRGYCGGYCASWFRLRCTCYRCG

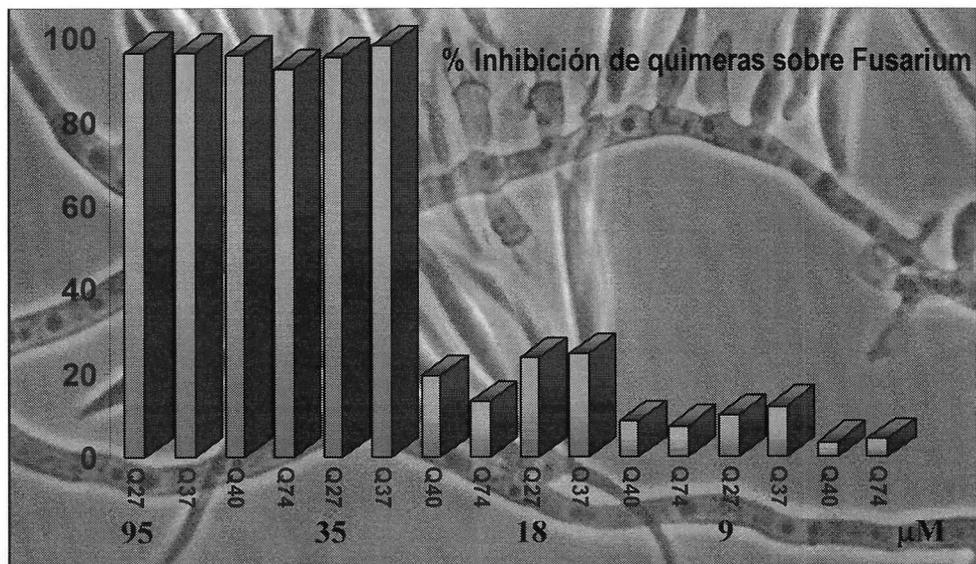
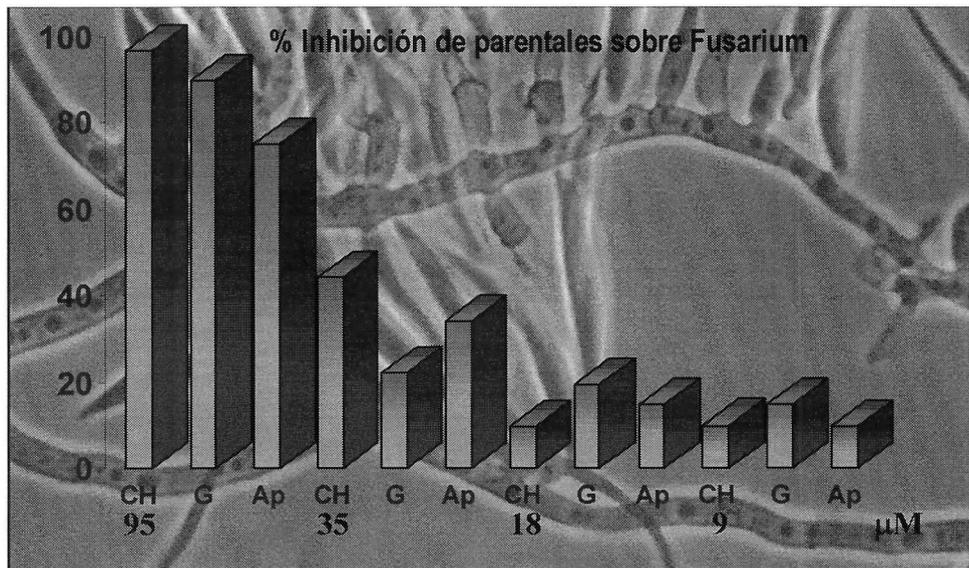
Rojo: *Argopecten*
Verde: *Mytilus*
Azul: Mutación
Fucsia: *M. chilensis*

En esta figura. **Panel A**, aparecen las secuencias aminoacídicas de las tres líneas parentales y de las cuatro quimeras seleccionadas, generadas como híbridos presentando en el extremo amino la secuencia PelB, o señal de exportación, y en extremo carboxilo la secuencia HisTag que como su nombre lo dice es una secuencia enriquecida en histidinas que permite su eventual purificación en columnas *ad hoc*. En el **Panel B**, se indican las contribuciones aminoacídicas de cada línea parental en las quimeras. Las heteroquimeras Q-37 y Q-74 se derivan de la recombinación de las secuencias parentales de *A. purpuratus* y *M. galloprovincialis* mientras que Q-27 y Q-40 corresponden a homoquimeras, de *M. galloprovincialis* en el primer caso y de *A. purpuratus* el segundo, ambas con un aminoácido diferente.

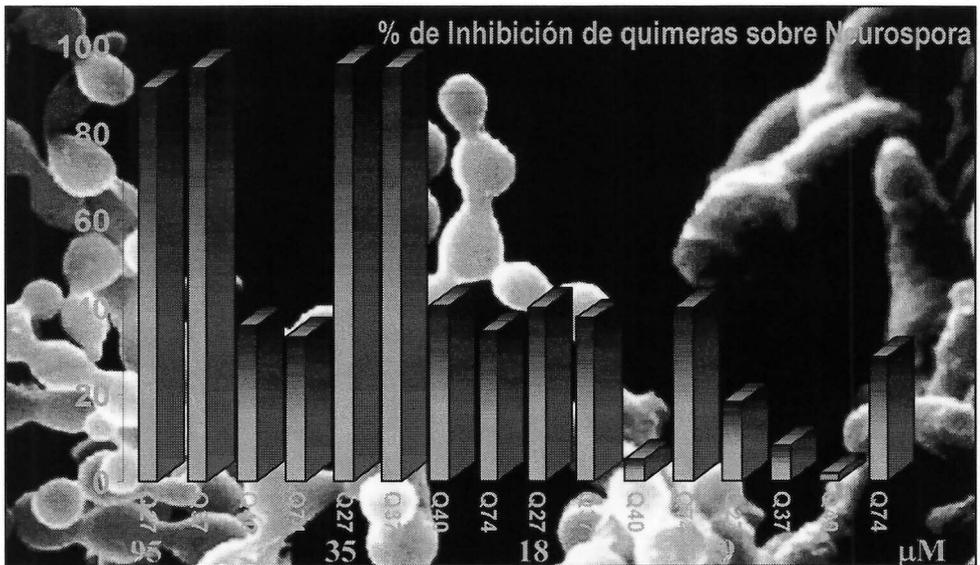
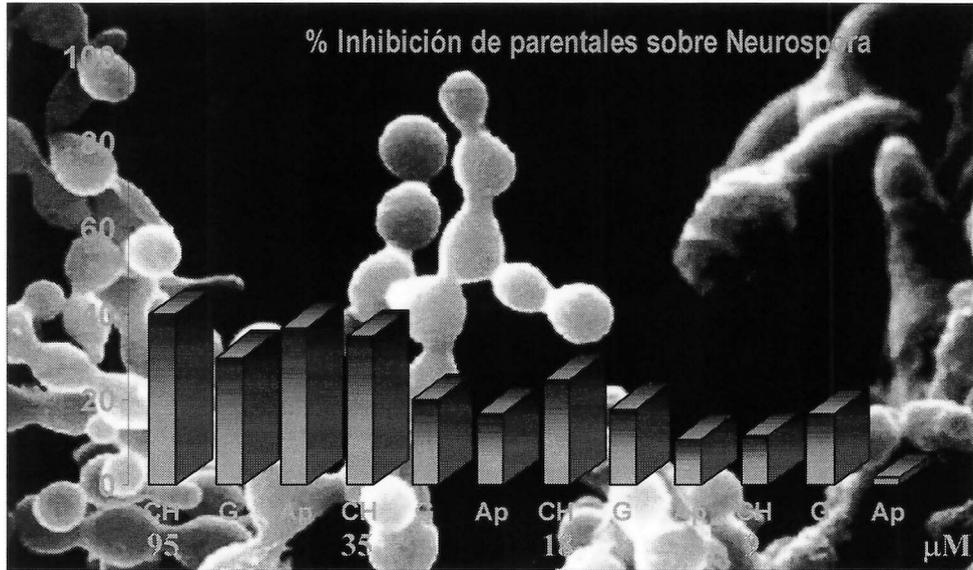
Periodo Final

- Purificación parcial de los péptidos parentales y quiméricos expresados en BL21
- Determinación de actividad antimicrobiana
- Evaluación de citotoxicidad

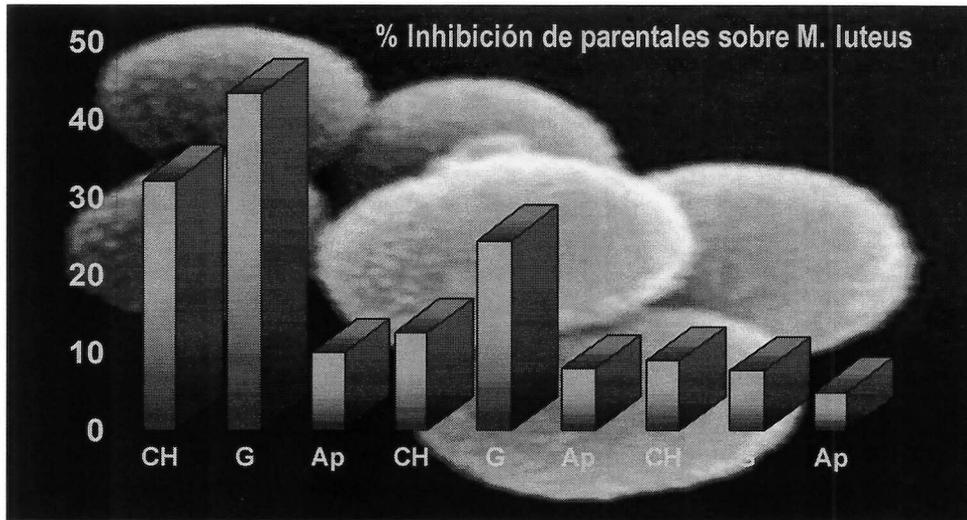
Enriquecimiento de la actividad antifúngica de las quimeras Q 27 y Q 37



Enriquecimiento de la actividad antifúngica de las quimeras Q 27 y Q 37



Enriquecimiento de la actividad antibacteriana de las quimeras Q 40 y Q 74

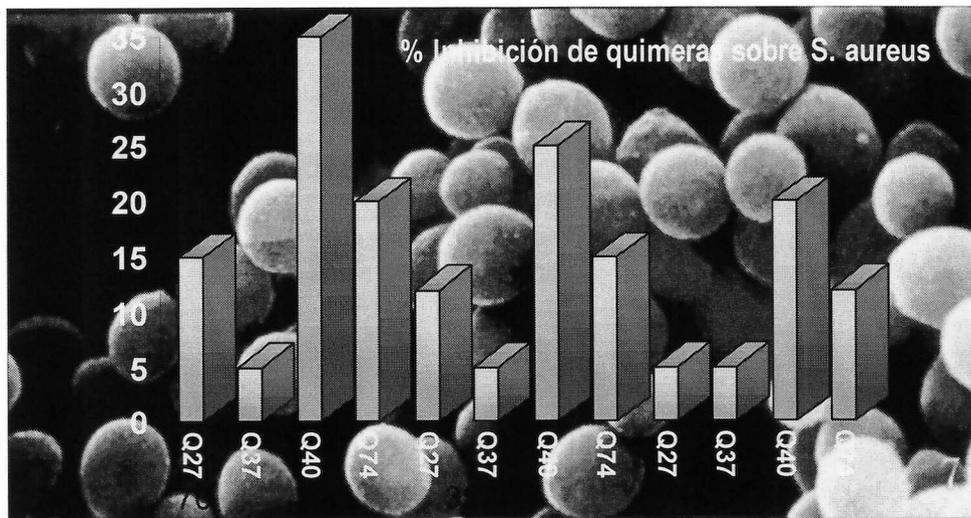
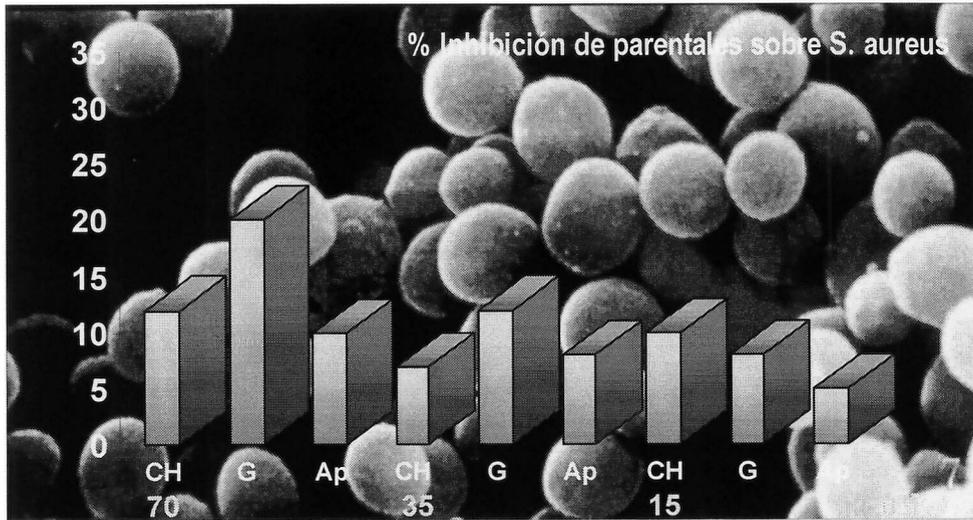


...M

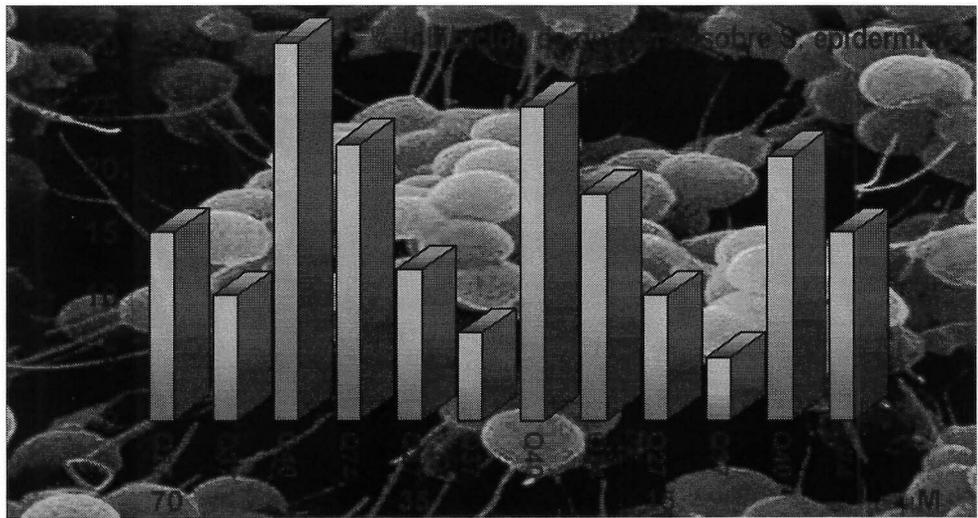
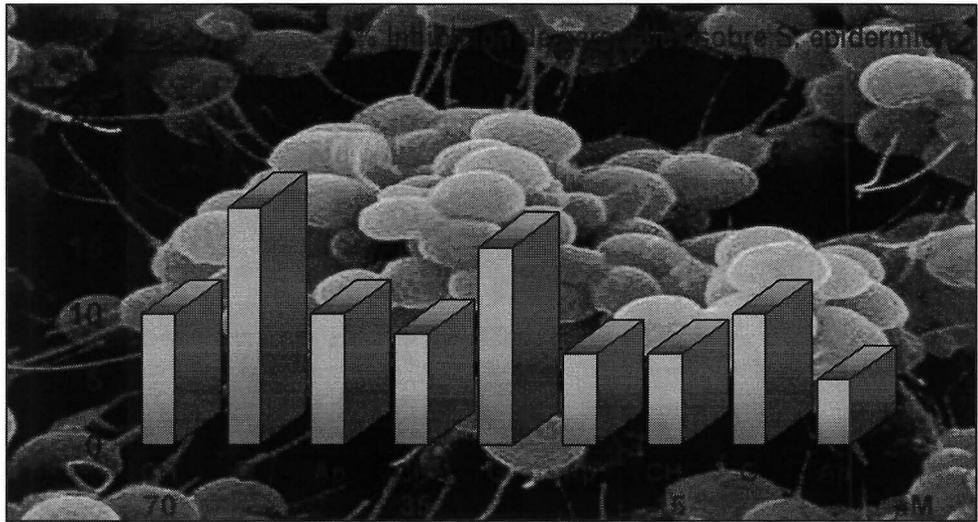


...M

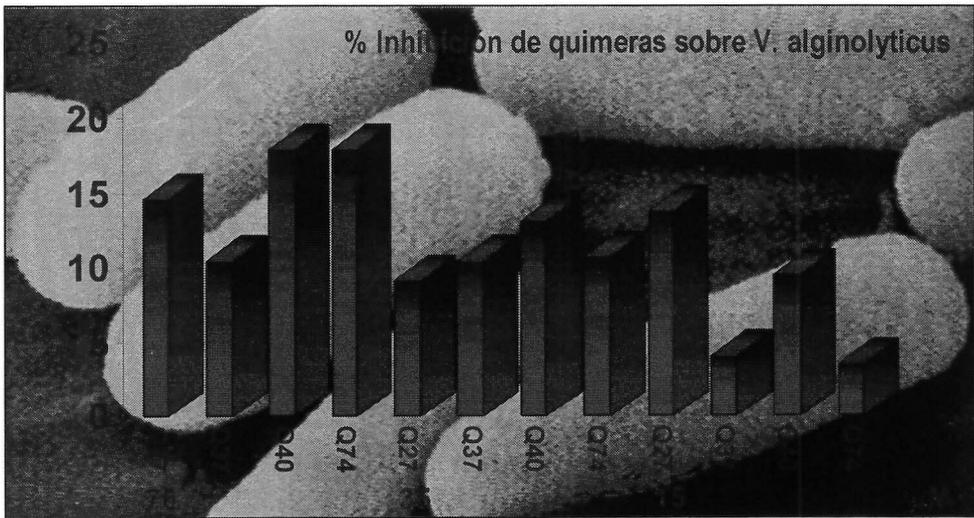
Enriquecimiento de la actividad antibacteriana de las quimeras Q 40 y Q 74



Enriquecimiento de la actividad antibacteriana de las quimeras Q 40 y Q 74



Enriquecimiento de la actividad antibacteriana de las quimeras Q 40 y Q 74



Relación de la actividad antifúngica entre parentales y quimeras

	<i>Fusarium</i>	<i>Neurospora</i>	
Q 37	duplica	quintuplica	MIC 50%
Q 27			

Relación de la actividad antibacteriana entre parentales y quimeras

	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	
Q 40	duplica	duplica	MIC 30%
Q 74	triplica		
		35 μ M	

NOMBRE	μM	MIC %	Fusarium	Neurospora	M. luteus	S. aureus	S. epidermidis	V. alginolyticus
M. chilensis	█	█	+++++					
	>35	38		+++++				
	>70	33			+++++			
	>15	13				+++++		
	>70	10					+++++	
	>70	18						+++++
M. galloprov.	█	█	+++++					
	>95	30		+++++				
	>70	45			+++++			
	>70	20				+++++		
	>70	18					+++++	
	>35	10						+++++
A. purpuratus	█	█	+++++					
	>95	40		+++++				
	>70	10			+++++			
	>70	10				+++++		
	>70	10					+++++	
	>70	5						+++++
Q - 27	█	█	+++++					
	█	█		+++++				
	>70	15			+++++			
	>70	15				+++++		
	>70	15					+++++	
	>70	15						+++++
Q - 37	█	100	+++++					
	█	█		+++++				
	>70	20			+++++			
	>70	5				+++++		
	>70	10					+++++	
	>70	10						+++++
Q - 40	>95	98	+++++					
	>35	40		+++++				
	█	█			+++++			
	>70	35				+++++		
	>70	30					+++++	
	>70	18						+++++
Q - 74	>95	95	+++++					
	>95	40		+++++				
	█	█			+++++			
	>70	20				+++++		
	>70	23					+++++	
	>70	18						+++++

Estos resultados reflejan lo siguiente:

- Las Quimeras presentan un rango de actividad mayor que las líneas parentales
- Q-27 y Q-37 son esencialmente antifúngicas
- Q-40 y Q-74 inhiben selectivamente a *M. luteus* con un MIC de 50 %.

Evaluación de citotoxicidad sobre células de peces en cultivo

Péptido con actividad antimicrobiana	% de viabilidad
M ch	82.1 ± 2.5
M g	78.7 ± 3.2
A p	84.4 ± 2.5
Q27	79.9 ± 1.8
Q37	82.4 ± 2.0
Q40	84.4 ± 1.5
Q74	80.6 ± 3.1
Control negativo	79.1 ± 3.2

Los péptidos parentales y quiméricos, a una concentración de 3µg/ul, no presentan un efecto citotóxico sobre la línea celular CHSE-214, derivada del tejido renal embrionario de *Oncorhynchus tshawytscha* (salmón chinook). Las 3 horas de duración del ensayo, que no equivalen a los ensayos ejecutados sobre bacterias y hongos en microplaca, se justifica porque las líneas celulares no están incubadas en un medio de cultivo sino que en un tampón fosfato (PBS) por lo que se restringe la viabilidad de las células en ensayos que superen este tiempo. Por otra parte cuando se evalúa el efecto de los péptidos sobre bacterias y hongos se trabaja en base a una curva de crecimiento cuantificable espectrofotométricamente, que requiere a los menos 24 horas. La estimación de la citotoxicidad de los péptidos sobre las líneas celulares durante 3 horas se compensa triplicando la concentración utilizada. Adicionalmente, se ha establecido para ensayos de citotoxicidad, que si una molécula

es tóxica sobre líneas celulares, su efecto se manifiesta durante las 3 primeras horas de incubación.

6.- Fichas Técnicas y Análisis

La perspectiva de los péptidos quiméricos Q27 y Q37 está en su aplicación antifúngica sobre el fitopatógeno *Fusarium* pues duplicó la actividad del parental.

Las quimeras Q40 y Q74 se perfilan como efectivos antibióticos naturales de aplicación ectópica sobre *S.aureus* y potencialmente contra otros Gram +.

7.- Problemas enfrentados

7.1 Obtención de quimeras

Se reemplazó el clon de cecropina por un gen de defensina de *M. galloprovincialis* para la construcción de quimeras, debido a que informaciones recientes indican que la cecropina tiene un efecto perjudicial en hepatocitos. Considerando lo anterior, algunas de las heteroquimeras construidas podrían conservar un potencial tóxico. Esto sería contraproducente para su empleo en el control de patógenos, que afecten productos agrícolas y/o acuícolas, que ha sido la proyección inicial planteada en el proyecto.

Con respecto a la inclusión de secuencias de *Mytilus galloprovincialis*, para la construcción de heteroquimeras, obedeció a la intención de considerar las ventajas de una variabilidad intrafamiliar. Además que disponíamos de DNA genómico de esa especie (cedido gentilmente por nuestros colaboradores europeos), y partidores diseñados por nuestro grupo, que amplificaban exitosamente un gen de defensina.

7.2 Caracterización de clones quimera mediante digestión con Nucleasa S1

La técnica de digestión de híbridos con la enzima S-1 reemplazó a la de caracterizar clones mediante DGGE. Esta nueva técnica permite discriminar secuencias híbridas generadas por el proceso de shuffling que se diferencian de los parentales desde un par nucleótidos. Estas diferencias se establecieron mediante hibridización molecular entre las moléculas parentales (*M. chilensis*, *M. galloprovincialis*, *A. purpuratus*) y las quimeras provenientes del proceso de recombinación.

7.2.1. Condiciones Mejoradas de Digestión con Nucleasa S1.

DNAs de *M. chilensis* y de *M. galloprovincialis*, como productos de amplificación por PCR (denominados DNAs Parentales), se adicionaron mezclados en una proporción 1:1 o por separados, en una cantidad de $\approx 2 \mu\text{g}$ totales, y fueron tratados como se indica:

- A un volumen de 80 μL de reacción en tampón de la nucleasa S1, cubrir con 50 μL de aceite mineral y desnaturalizar por calentamiento en termociclador durante 10 min a 95°C. Se enfría inmediatamente en hielo por 5 o más min, para mantener el DNA en el estado de hebra simple.
- Incubar por $\approx 16:40$ horas a la temperatura constante de 68°, 69°, 70° ó 71°C en termociclador.
- Finalizada la incubación, mantener refrigerado el DNA a 4° hasta su uso.
- Adicionar Nucleasa S1 en una concentración final de 0,167 U/ μL de reacción, en la pared del tubo.
- Centrifugar brevemente y tomar una alícuota (To), a un tubo que contiene EDTA frío para una concentración final de 20mM (en un exceso), mezclar y mantenerlo en hielo.
- Incubar a 37° por 20, 30 ó 40 min, tomando las alícuotas correspondientes y detener la reacción como en el paso anterior.

Una vez procesadas todas las muestras y mantenidas en frío, resolver los productos de la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en tampón TBE y realizar la transferencia a membrana según se describe.

7.3. Resolución por HPLC

La recuperación cuantitativa de las quimeras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue inferior a la esperada, lo que se tradujo en un aumento de los costos a nivel preparativo, situación que nos llevó a eliminar este paso metodológico. Esto se sustenta por el alto grado de resolución alcanzado en las dos etapas de purificación previas, intercambio catiónico y de hidrofobicidad, que otorgaban a las muestras un alto grado de pureza.

La eliminación de la etapa de purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se vio favorecida al incorporar como alternativa de expresión el sistema pET 27b – *E.coli* BL 21. Este sistema incluye la salida del péptido al espacio periplásmico de la cepa bacteriana gracias a la presencia de una reducida señal de exportación que no afecta la actividad antimicrobiana de la molécula blanco. (ver resultados) así lo confirma. La pureza del péptido obtenido fue confirmada por caracterización electroforética en geles de Tris-Tricina, lo que ratifica que este método tiene ventajas para la proyección comercial del producto, puesto que es más rápido, más económico y no requiere de una infraestructura tan sofisticada como HPLC.

8.- Calendario de Ejecución

10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)				
AÑO 2002				
Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1.	1.1 Selección de secuencias de defensinas de <i>Mytilus chilensis</i> .	Aislamiento y caracterización de las secuencias nucleotídicas para defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
1.	1.2	Caracterización de las secuencias peptídicas de las defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
2.	2.1 Selección de un clon de cecropina	A partir de la información publicada obtener secuencia nucleotídica de cecropina	7/1/02	30/3/02
2.	2.2 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i>	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. chilensis</i>	4/3/02	30/4/02
2.	2.3 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i> y cecropina	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. chilensis</i> y cecropina	4/3/02	30/4/02
3.	3.1 Caracterización de la secuencia quimérica	Caracterización de la (o las) secuencia (s) quimérica (s) mediante DGGE	4/3/02	31/5/02
3.	3.2	Caracterización de la secuencia quimérica mediante secuenciación nucleotídica de DNA	4/3/02	31/5/02
3	3.3	Estimación de eventuales cambios aminoacídicos de la secuencia quimera	4/3/02	31/5/02
4.	4.1 Clonaje de las secuencias quiméricas	Clonaje de las secuencias quiméricas en sistema modelo	2/5/02	31/6/02
4.	4.2 Diseño de partidores para el rescate de la quimera	Secuenciación de DNA estimación de eventuales cambios aminoacídicos.	2/5/02	31/6/02
4.	4.3 Expresión de péptido quimérico	Expresión de clones como proteínas de fusión en sistema de alta eficiencia	2/5/02	31/10/02
4.	4.4 Purificación de péptido quimérico	Purificación de péptido quimérico desde el sistema de expresión (caulobacter) como proteína de fusión.	2/5/02	31/10/02 HITO: péptido quimera caracterizado molecularmente y expresado

10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)**AÑO 2003**

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5.	5.1 Caracterización cromatográfica del péptido quimera	Caracterización cromatográfica en fase reversa por HPLC del péptido quimera.	1/8/02	28/06/03
6.	6.1	Caracterización Electroforética de péptidos quimeras en geles bidimensionales de policrilamida por y por isoelectroenfoque	1/8/02	30/3/03
7.	7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana en microplaca.	1/8/02	30/3/03 HITO: péptido quimera con actividad antimicrobiana caracterizado por HPLC-PAGE e IEF
7.	7.2 Evaluación de la citotoxicidad	Evaluación <i>in vitro</i> de la potencial citotoxicidad de los péptidos quimeras.	2/1/03	3/6/03
7.	7.3 Selección de péptidos quiméricos más eficientes	Selección de péptidos quiméricos con la mayor productividad, rango de acción y actividad específica.	2/1/03	30/6/03
8.	8.1 Evaluación de péptidos sobre patógenos acuícolas	Evaluación de la acción de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura.	1/3/03	30/12/03 HITO: péptido quimera con alta actividad antimicrobiana y patógenos acuícolas y baja citotoxicidad
9.	9.1			

	Preparación en gran escala de péptido seleccionado	Preparación y purificación en cantidades de un péptido seleccionado.	1/4/03	30/12/03
9.	9.2 Estudios de mercado	Estudio de mercado de empleo de los péptidos descubiertos.	1/6/03	30/12/03
	9.3 Modelo de comercialización.	Modelo eventual de comercialización de los péptidos (licencia de patente, formación empresa biotecnológica, producción y comercialización compartida).	1/8/03	28/2/04

**ACTIVIDADES EJECUTADAS
ENERO – ABRIL 2002**

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1.	1.1 Selección de secuencias de defensinas de <i>Mytilus chilensis</i> .	Aislamiento y caracterización de las secuencias nucleotídicas para defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
1.	1.2	Caracterización de las secuencias peptídicas de las defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
2.	2.1 Selección de un clon de cecropina	A partir de la información publicada obtener secuencia nucleotídica de una defensina de M. galloprovincialis .	7/1/02	30/3/02
2.	2.2 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. chilensis</i>	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. chilensis</i>	4/3/02	30/4/02
2.	2.3 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. chilensis</i> y <i>M. galloprovincialis</i>	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. chilensis</i> y M. galloprovincialis	4/3/02	30/4/02

**ACTIVIDADES EJECUTADAS
MAYO – NOVIEMBRE 2002**

3.	3.1 Caracterización de la secuencia quimérica	Caracterización de la (o las) secuencia (s) quimérica (s) pordigestión con nucleasa S1	4/3/02	31/5/02
3.	3.2	Caracterización de la secuencia quimérica mediante secuenciación nucleotídica de DNA	4/3/02	31/5/02
3	3.3	Estimación de eventuales cambios	4/3/02	31/5/02

		aminoacídicos de la secuencia quimera		
4.	4.1 Clonaje de las secuencias quiméricas	Clonaje de las secuencias quiméricas en sistema modelo	2/5/02	31/6/02
4.	4.2 Diseño de partidores para el rescate de la quimera	Secuenciación de DNA estimación de eventuales cambios aminoacídicos.	2/5/02	31/6/02
4.	4.3 Expresión de péptido quimérico	Expresión de clones como proteínas de fusión en sistema de alta eficiencia	2/5/02	31/10/02
4.	4.4 Purificación de péptido quimérico	Purificación de péptido quimérico desde el sistema de expresión (caulobacter) como proteína de fusión. Purificación del péptido por lisis de <i>E. coli</i>, no como proteína de fusión.	2/5/02	31/10/02 HITO: péptido quimera caracterizado molecularmente y expresado

**ACTIVIDADES EJECUTADAS
DICIEMBRE DE 2002 – JUNIO 2003**

Objetivo Especif. Nº	Actividad Nº	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5.	5.1 Caracterización cromatográfica del péptido quimera	Caracterización cromatográfica en fase reversa por HPLC del péptido quimera. Caracterización cromatográfica por intercambio catiónico e hidrofobicidad.	1/8/02	28/06/03
6.	6.1 Caracterización electroforética del péptido quimera	Caracterización Electroforética de péptidos quimeras en geles bidimensionales de policrilamida por y por isoelectroenfoque	1/8/02	30/3/03
7.	7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana en microplaca.	1/8/02	30/3/03 HITO: péptido quimera con actividad antimicrobiana.
7.	7.2 Evaluación citotoxicidad	Evaluación <i>in vitro</i> de la potencial citotoxicidad de los péptidos quimeras.	2/1/03	3/6/03

7.	7.3 Selección de péptidos quiméricos más eficientes	Selección de péptidos quiméricos con la mayor productividad, rango de acción y actividad específica.	2/1/03	30/6/03
----	---	--	--------	---------

**ACTIVIDADES EJECUTADAS
JULIO 2003 – OCTUBRE 2003**

5.	5.1 Caracterización cromatográfica del péptido quimera	Caracterización cromatográfica por intercambio catiónico e hidrofobicidad.	1/07/03	30/09/03
6.	6.1 Caracterización electroforética del péptido quimera	Caracterización Electroforética de péptidos quimeras en geles bidimensionales de policrilamida por y por isoelectroenfoque Se reemplazó por la caracterización funcional de las quimeras (7.1-7.3)		
7.	7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana en microplaca.	1/08/03	30/10/03
7.	7.2 Evaluación de la citotoxicidad	Evaluación <i>in vitro</i> de la potencial citotoxicidad de los péptidos quimeras.	1/08/03	30/10/03
7.	7.3 Selección de péptidos quiméricos más eficientes	Selección de péptidos quiméricos con la mayor productividad, rango de acción y actividad específica.	1/08/03	30/10/03

**ACTIVIDADES EJECUTADAS
NOVIEMBRE DE 2003 – DICIEMBRE 2003**

8.	8.1 Evaluación de péptidos sobre patógenos acuícolas	Evaluación de la acción de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura.	1/3/03	30/12/03 HITO: péptido quimera con alta actividad antimicrobiana y patógenos acuícolas y baja citotoxicidad
----	---	---	--------	---

9.	9.1 Preparación en gran escala de péptido seleccionado	Preparación y purificación en cantidades de un péptido seleccionado. No se realizó	1/4/03	30/12/03
9.	9.2 Estudios de mercado	Estudio de mercado de empleo de los péptidos descubiertos. *	1/6/03	30/12/03
	9.3 Modelo de comercialización.	Modelo eventual de comercialización de los péptidos (licencia de patente, formación empresa biotecnológica, producción y comercialización compartida). *	1/8/03	28/2/04

* Ver anexos Planificación Estratégica y Plan de Negocios CT

9.- Difusión de los Resultados

La difusión de los resultados del proyecto comenzó con el **Primer FORO Biotecnología acuícola y agrícola: del laboratorio al mercado**, organizado por el Centro de Transferencia Tecnológica de la Pontificia UCV, CT Valparaíso. Con el fin de dar a conocer públicamente las moléculas antimicrobianas descubiertas en un contexto de oportunidades para otorgarles utilización práctica, se diseñó este evento fundamentalmente para un público interdisciplinario e intersectorial del ámbito industrial y orientado a negocios biotecnológicos. Entre los propósitos, el evento tuvo como objetivo posicionar el tema biotecnológico en la V Región, generar interés empresarial por utilizar benéficamente estos avances y descubrimientos, así como también generar inquietud por enlazar este tipo de ciencia a un contexto de producción industrial. Además de la Autoridad máxima de la región, contó con la participación del Rector de la Universidad y otros personeros públicos y privados. Convocó a inventores, investigadores del área biotecnológica, empresarios del rubro, profesionales biotecnológicos, emprendedores interesados en iniciativas privadas de negocios, inversionistas que buscan poner dineros en proyectos de alta rentabilidad, representantes del sector público interesados en apoyar iniciativas de este tipo.

La presentación de los descubrimientos específicos de moléculas con propiedades antimicrobianas estuvo a cargo de la Dra. Gloria Arenas, mientras que el Dr. Sergio Marshall expuso sobre las inversiones en investigación científica, recalcando que es absolutamente necesario para posteriormente culminar con productos en el mercado. Un potencial usuario de estas moléculas antibacterianas y antifúngicas es el sector salmonero, motivo por el cual expuso el Sr. Adolfo Labial, Gerente General del Instituto Tecnológico del Salmón (INTESAL), quien recalcó las necesidades críticas que registra esta industria y la apelación a los biotecnólogos para buscar adecuadas soluciones a estos problemas. Se tuvo oportunidad de conocer experiencias de desarrollo del sector biotecnológico en Estados Unidos mediante la intervención del Dr. Fernando Quezada, Director Biotechnology Center of Excellence Corporation, quien mostró la diversidad de aspectos que concurren para generar industrias en esta área, siendo muy necesarios tomar en cuenta

para emprender con éxito en este sector en Chile y particularmente en la región de Valparaíso.

Se trabajó con una masa crítica importante de profesionales interesados en la biotecnología, convocándolos a llevar adelante sus propias iniciativas. Se ejercitaron en grupos para desarrollar ideas de emprendimientos de proyectos biotecnológicos que integren la fase científicas, de transferencia tecnológica y las etapas de industrialización y distribución de productos innovadores para satisfacer necesidades reales de los usuarios. Con este ejercicio de motivación, el Centro de Transferencia Tecnológica de la Pontificia UCV ha entrado en conversaciones demostrativas de reales intereses en poder explotar industrialmente moléculas antimicrobinadas como las descubiertas en este proyecto FIA. Se considera que este mecanismo de difusión ha resultado una buena manera de realzar la importancia del proyecto, al contextualizarlo en la industria biotecnológica completa y como sector cuyo desarrollo debe ser promocionado en la región. Cabe destacar que la Pontificia UCV ya ha logrado un ejemplo de producto biotecnológico que se lanzará al mercado a través de una empresa que está adquiriendo la licencia exclusiva del producto, de manera que estos nuevos productos debieran llegar a transferirse mediante estos mismos procedimientos especializados disponibles en su Centro de Transferencia Tecnológica, representando una forma de difusión selectiva adicional, cuyo conocimiento específico comenzará a llegar a quienes se interesen y se encarguen verdaderamente en que estos descubrimientos tengan real aplicación.

10.- Impactos del Proyecto

Como resultado del proyecto se ha logrado expresar en *E. coli* BL 21 péptidos parentales del tipo defensina de los moluscos chilenos *Mytilus chilensis* y *Argopecten purpuratus*. Además se han generado y expresado cuatro quimeras derivadas de los parentales *Mytilus galloprovincialis* y *Argopecten purpuratus* con un amplio rango de actividad antimicrobiana superior a la de los parentales, sobre bacterias Gram + y hongos, siendo principalmente de características antifúngicas.

Por lo anterior podemos afirmar que el impacto científico del proyecto ha sido el desarrollo biotecnológico evidenciado en la capacidad de generar nuevas moléculas antimicrobianas, con secuencias nucleotídicas modificadas que pueden ser expresadas en sistemas heterólogos. Este último hecho permite estimar una producción masiva en biorreactores, que proporcionaría cantidades suficientes para su aplicación en el campo. Además las quimeras presentaron una mayor actividad sobre hongos o bacterias con respecto a las naturales, por lo que el efecto antimicrobiano se consigue con menores concentraciones y por lo tanto resultarían más eficientes frente a patógenos.

El impacto económico del proyecto surgirá cuando las moléculas descubiertas se empleen en el desarrollo de productos que llegarán a usuarios finales a través del mercado. Para que ello ocurra, será necesario evaluar las posibles aplicaciones a fin de diseñar nuevos productos, patentarlos y entregar las licencias a fabricantes que se encarguen de producirlos en forma masiva. En otros países en que grupos de investigación están desarrollando este tipo de moléculas han concitado alto interés de las empresas del sector biotecnológico, al permitirles el desarrollo de nuevos proyectos de inversión rentables. Considerando como referencia un producto de utilización en la acuicultura, que la Pontificia UCV ha licenciado a una compañía farmacéutica extranjera, se podría pensar que los péptidos generarían productos por US\$6 millones anuales, dependiendo del tamaño del mercado. El valor socio-económico de los péptidos quiméricos debiera ser elevado, si se considera que podrían solucionar problemas que actualmente requieren grandes inversiones para evitarlos, como por ejemplo en el combate de hongos en la salmonicultura que genera pérdidas por US\$30 millones en este sector. Adicionalmente podrían ser una solución a la

situación residual de antibióticos y otros elementos químicos en la carne de salmón, que actualmente está motivando rechazos de envíos en mercados internacionales, con el consecuente deterioro de la imagen país. Por tratarse de descubrimientos recientes y de una materia prima que deberá ser investigada en detalle para su uso en distintos productos, es imposible tener una evaluación precisa de su impacto económico actual. Esto se resolverá con subsiguientes evaluaciones económicas privadas que se deberán realizar para determinar los flujos y las inversiones necesarias para concebir, crear, desarrollar, producir y comercializar cada producto.

El descubrimiento de moléculas naturales con efectos antimicrobianos es una actividad intensiva en investigación científica que se ha estado promoviendo apenas en los últimos cinco años en Chile. Por esta razón, se puede indicar que este proyecto FIA se contextualiza en un proceso inicial que busca otorgar importancia a esta línea de trabajo. Los impactos inmediatos son únicamente informativos sobre las posibilidades que nos ofrecen estos péptidos, no obstante que al descubrir moléculas con actividades antibacterianas y antifúngicas concretas como sucedió con este proyecto, las expectativas que se esbozan llevan el tema a un sitio importante desde el punto de vista de la industria farmacéutica.

Se descubrieron cuatro moléculas con propiedades antimicrobianas, dos de las cuales son antifúngicas (Q-27 y Q-37) y dos adicionales con efectos antibacterianos (Q-40 y Q-74). Para materializar productos concretos, existe el próximo desafío de generar péptidos puros, establecer con precisión la diversidad de enfermedades microbianas que pueden ser abatidas con estas moléculas, diseñar y desarrollar productos para su aplicación de acuerdo a las necesidades.

Otro aspecto relevante destacar, es la necesidad de proteger la propiedad industrial de las moléculas funcionales descubiertas en este proyecto a través del patentamiento de ellas y de sus aplicaciones en productos, lo que enriquecerá el patrimonio intelectual del país en el contexto internacional.

Al culminar el proyecto se efectuó el **Primer FORO Biotecnología acuícola y agrícola: del laboratorio al mercado**. Se realizó en los días jueves 13 y viernes 14 de mayo en el Círculo Español de Viña del Mar. Contó con la presencia inaugural del Sr. Intendente de la V Región, don Luis Guastavino; el Rector de la Pontificia UCV y otras autoridades universitarias y del FIA. Tuvo asistencia de 66 profesionales del área biotecnológica y empresarial. Detalles del programa se presenta en el folleto adjunto. Este evento impactó en la región, debido a que el Gobierno Regional manifestó interés en geolocalizar este tema en la zona. El encuentro se caracterizó por enfatizar la posibilidad que estos descubrimientos biotecnológicos se incorporen lo más rápido posible en los mercados.

11.- Conclusiones y Recomendaciones.

Conclusiones

- Se cumplieron los objetivos propuestos a cabalidad y en los tiempos estimados
- Se identificaron péptidos del tipo defensina en dos especies de bivalvos nativos
- Se incorporó el manejo biotecnológico a la generación de péptidos antimicrobianos recombinantes
- Todos los péptidos recombinantes fueron generados como híbridos en sistemas heterólogos
- Ninguno de los péptidos expresados tienen efecto citotóxico.
- Se generaron cuatro péptidos quiméricos: dos homoquimeras (Q-27 de mitílidos; y Q-40 de pectínido) y dos heteroquimeras (Q-37 y Q-74, ambas mitilido-pectínido).
- La actividad antimicrobiana de las quimeras es mayor que la de las líneas parentales.
- Hay especificidades que diferencian las quimeras: Q-23 y Q-37 son esencialmente antifúngicas y Q-40 y Q-74 inhiben el crecimiento de Gram positivas.
- Se estableció un procedimiento de purificación de péptidos recombinantes que puede escalarse a nivel comercial.

Recomendaciones:

- Sería ventajoso explorar otros sistemas heterólogos de expresión, que permitan recuperar al péptido recombinante sin secuencias adicionales para evaluar su real potencial antimicrobiana.
- Para la aplicación de los péptidos contra agentes patógenos en actividades acuícolas y/o agrícolas hay que asociarlos a matrices inertes o a portadores que faciliten su entrega dirigida.
- Considerar financiamiento adicional al grupo de trabajo para satisfacer alguna de las dos recomendaciones.

12 .- Otros Aspectos de Interés

No se consideran otros aspectos de interés para detallar en este capítulo.

13 .- Anexos

Actividad final del proyecto.

Foro de Biotecnología Acuícola y Agrícola: del laboratorio al mercado.

- Afiche de difusión
- Aviso en Diario El Mercurio de Valparaíso
- Base de datos de invitados
- Base de datos asistentes

14.- Bibliografia consultada

ADEREM, A. and ULEVITCH, R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, vol. 406, no. 6797, p. 782-787.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. and KAICHO, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2001, vol. 2, no. 8, p. 675-680.

AKIYAMA, N.; HIJIKATA, M.; KOBAYASHI, A.; YAMORI, T.; TSURUO, T. and NATORI, S. Anti-tumor effect of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect. *Anticancer Research*, 2000, vol. 20, no. 1A, p. 357-362.

ANDERSEN, J.; OSBAKK, S.; VORLAND, L.; TRAAVIK, T. and GUTTEBERG, T. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Research*, 2001, vol. 51, no. 2, p. 141-149.

ANDREU, D. and RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, no. 6, p. 415-433.

BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defence against infection (Review). *Respiratory Research*, 2000, vol. 1, no. 3, p. 141-150.

BECHINGER, B.; ZASLOFF, M. and OPELLA, S.J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sciences*, 1993, vol. 2, no. 12, p. 2077-2084.

BOHLMANN, H. The role of thionins in the resistance of plants. In: DATTA, S.K., MUTHUKRISHNAN, S. eds. *Pathogenesis-related proteins in plants*, CRC Press, 1999, p. 207-234.

BOMAN, H. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scandinavian Journal Immunology*, 1998, vol. 48, no. 1, p.15-25.

BOMAN, H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 1995, vol. 13, p.61-92.

BROEKAERT, W.; CAMMUE, B.; DE BOLLE, M.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G. and OSBORN, R. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, vol. 16, no. 3, p. 297-323.

BROEKAERT, W.; MARIEN, W.; TERRAS, F.; DE BOLLE, M.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S. and VANDERLEYDEN, J. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, no. 17, p. 4308-4314.

BROGDEN, K.; DE LUCCA, A.; BLAND, J. And ELLIOTT, S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceeding National Academy of Sciences USA*, 1996, vol. 93, no. 1, p. 412-416.

BŠCKHED, F.; ŠŠDERHŠLL, M.; EKMAN, P.; NORMARK, S. and RICHTER-DAHLFORS, A. Induction of innate immune responses by *E. coli* and purified LPS correlate to organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cellular Microbiology*, vol. 5. In press, 2003.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. and HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental Comparative Immunology*, 1999, vol. 23, no. 4-5, p. 329-344.

CHAKRABARTI, A.; GANAPATHI, T.R.; MUKHERJEE, P.K. and BAPAT, V.A. MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. *Planta*, 2003, vol. 216, no. 4, p. 587-596.

CHERNYSH, S.; KIM, S.I.; BECKEER, G.; PLESKACH, V.A.; FILATOVA, N.A.; ANIKIN, V.B.; PLATONOV, V.G. and BULET, P. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2002, vol. 99, no. 20, p. 12628-12632.

CHINCHAR, V.G.; WANG, J.; MURTI, G.; CAREY, C. and ROLLINS-SMITH, L. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology*, 2001, vol. 288, p. 351-357.

COLE, A.M.; DAROUICHE, R.O.; LEGARDA, D.; CONNELL, N. and DIAMON, G. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression subcellular localization and spectrum of activity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2000, vol. 44, no. 8, p. 2039-2045.

COLE, A.M.; LIAO, H.I.; GANZ, T. and YANG, O.O. Antibacterial activity of peptides derived from envelope glycoproteins of HIV-1. *FEBS Letters*, 2003, vol. 535, no.1-3, p. 195-199. 278

COM, E.; BOURGEON, F.; EVRARD, B.; GANZ, T.; COLLEU, D.; JEGOU, B. and PINEAU, C. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biology of Reproduction*, 2003, vol.68, p. 95-104.

CUDIC, M.; CONDIE, B.A.; WEINER, D.J.; LYSENKO, E.S.; XIANG, Z.Q.; INSUG, O.; BULET, P. and OTVOS, JR. L. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*, vol. 24. In press, 2003.

CUDIC, M. and OTVOS, JR. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets*, 2002, vol. 3, p. 101-106.

DANGL, J.L. and JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 2001, vol. 411, no. 6839, p. 826-833.

DECKER, H.; RYAN, M.; JAENICKE, E. And TERWILLIGER N. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 2, p. 17796-17799.

DE LUCCA, A.J. Antifungal peptides: potential candidates for the treatment of fungal infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2000, vol. 9, no. 2, p. 273-299.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P. And BACHÈRE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 45, p. 47070-47077.

DIMARCQ, J.L.; BULET, P.; HEBRU, CH. And HOFFMANN, J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, p. 465-477.

ERNST, R.K.; GUINA, T. and MILLER, S.I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *Journal of Infectious Diseases*, 1999, vol. 179, no. suppl. 2, p. S326-30.

EZEKOWITZ, Alan and HOFFMANN, Jules. *Innate Immunity*. Humana Press, 2003. 410 p. ISBN 1588290468.

FALES-WILLIAMS, A.J.; GALLUP, J.M.; RAMIREZROMERO, R.; BROGDEN, K.A. and ACKERMAN, M.R. Increased anionic peptide distribution and intensity during progression and resolution of bacterial pneumonia. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002, vol. 9, no. 1, p.28-32.

FEARON, D.T. Innate immunity-beginning to fulfil its promise? *Nature Immunology*, 2000, vol. 2, p. 102 -103.

FIMLAND, G.; EIJSINK, V.G. and NISSEN-MEYER, J. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*, 2002, vol. 148, p. 3661 - 3670.

FOGACA, A.C.; DA SILVA, P.I. JR.; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.M. and DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microp*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no. 36, p. 25330-25334.

FROHM, M.; GUNNE, H.; BERGMAN, A.C.; AGERBERTH, B.; BERGMAN, T; BOMAN, A.; LIDEN, S; JORNVALL, H. and BOMAN, H.G. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *European Journal of Biochemistry*, 1996, vol. 237, no. 1, p.86-92.

GANZ, T. The role of hepcidin in iron sequestration during infections and in the pathogenesis of anemia of chronic disease. *Israeli Medical Association Journal*, 2002, vol. 4, no. 11, p. 1043-1045.

GAO, A.G.; HAKIMI, S.M.; MITTANCK, CA.; WU, Y.; WOERNER, B.M.; STARK, D.M.; SHAH, D.M.; LIANG, J. and ROMMENS, C.M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18, no. 12, p. 1307-1310.

GARCIA-OLMEDO, F; MOLINA, A. and ALAMILO, J.M. Plant defense peptides. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, p.479-491.

GENNARO, R. and ZANETTI, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 2000, vol. 55, N°.1, p.31-49.

HANCOCK, R.E.W. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2000, vol. 9, p. 1723-1729.

HANCOCK, R.E.W. and CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics (Minireview). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1999, vol. 43, no. 6, p. 1317-1323.

HANCOCK, R.E.W. and LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 1998, vol. 16, p. 82-88.

HAUGHT, C.; DAVIS, G.D.; SUBRAMANIAN, R.; JACKSON, K.W. and HARRISON, R.G. Recombinant production and purification of novel antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, vol. 57, no. 1, p. 55-61.

HIEMSTRA, P.S.; EISENHAUER, P.B.; HARWIG, S.S.; VAN DER BARSELAAR, M.T.; VAN BURTH, R. And LEHRER, R.I. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infection and Immunity*, 1993, vol. 61, no. 7, p. 3038-3046.

HIRSH, J. Bactericidal action of histone. *The Journal of Experimental Medicine*, 1958, vol. 108, p. 925-944.

HOFFMANN, J.A. and REICHHART, J.M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*, 2002, vol. 3, no. 2, p. 121-126.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS F.C.; JANEWAY C.A. and EZEKOWITZ R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5418, p. 1313-1318.

HONG, R.W.; SHCHEPETOV, M.; WEISER, J.N.; AXELSEN, P.H. Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, vol. 47, no.1, p. 1-6.

HUBERT, F.; NEL, T. and ROCH, P. A member of the arthropod defensin family from edible mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 1996, vol. 240, no. 1, p. 302-306.

HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T. And BOMAN, H.G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 1980, vol. 106, no. 1, p. 7-16.

IWANAGA, S.; MUTA, T.; SHIGENAGA, T.; MIURA, Y.; SEKI, N.; SAITO, T. and KAWABATA, S. Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1994, vol. 712, p. 102-116.

JACK, R.W.; TAGG, J.R. and RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Review*, 1995, vol. 59, no. 2, p. 171-200.

JAMES C.; ROVERSI, P. and TAWFIK, D.S. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*, 2003, vol. 299, no. 5611, p.1362-1367.

JONES, E.M.; SMART, A.; BLOOMBERG, G.; BURGESS, L. and MILLER, M.R. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1994, vol. 77, no. 2, p. 208-214.

KOLTER, R. and MORENO F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Review of Microbiology*, 1992, vol. 46, p. 141-163.

KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; CONDIE B.A.; HOFFMANN R. and OTVOS L. Jr. The antibacterial pyrrolic peptide inhibits the ATPase action of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, no. 10, p. 3016-3026.

KRIJGSVELD, J.; ZAAT, S.A.J.; MEELDIJK, J.; VAN VEELLEN, P.A.; FANG, G.; POOLMAN, B.; BRANDT, E.; EHLERT, J.E.; KUIJPERS, A.J.; ENGBERS, G.H.M.; FEIJEN, J.; and DANKERT, J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets are Cterminal deletion products of CXC chemokines. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 27, p. 20374- 20381.

LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W. and ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, vol. 295, no. 4, p. 796-799.

LAMBERTY, M.; ZACHARY, D.; LANOT, R.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; HOFFMANN, J.A. and BULET, P. Insect immunity. constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in termite insect. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 6, p. 4085-4092.

LAUTH, X.; SHIKE, H.; BURNS, J.C.; WESTERMAN, M.E.; OSTLAND, V.E.; CARLBERG, J.M.; VAN OLST, J.C.; NIZET, V.; TAYLOR, S.W.; SHIMIZU, C.H. and BULET, P. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidins, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 7, p. 5030-5039.

LEEM, J.Y.; JEONG, I.L.; PARK, K.T. and PARK, H.Y. Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S. *FEBS Letters*, 1999, vol. 442, no. 1, p. 53-56.

LEEM, J.Y. Purification and characterization of N--alanyl- 5-S-gluthathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, no.23, p. 13573-13577.

LEHRER, R.I. and GANZ, T. Defensin of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology*, 2002, vol. 14, no. 1, p. 96-102.

LEMAITRE, C.; ORANGE, N.; SAGLIO, P.; SAINT, N.; GAGNON, J. and MOLLE, G. Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *European Journal of Biochemistry*, 1996, vol. 240, no. 1, p. 143-149.

LI ,S.S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; LARSSON, R.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. And CLAESON, P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochemistry Journal*, 2002, vol. 366, no. 2, 405-413.

LIU, L.; ROBERTS, A.A. and GANZ, T. By IL-1 Signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, 2003, vol. 170, no. 1, p. 575-580.

LIU, Y.; LUO, J.; XU, C.; REN, F.; PENG, C.; WU, G. And ZHAO, J. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, no. 4, p.1015-1024.

LÜDERS, T.; BIRKEMO, G.A.; FIMLAND, G.; NISSENMEYER, J. and NES, I.F. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, no. 3, p. 1797-1799.

MAINOUS III, Arch and POMEROY, Claire. *Management of Antimicrobials in Infectious Diseases*. Humana Press, 2001. 349 p. ISBN 0-89603-821-1.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S. and VOVELLE, F. The solution structure of gomesin an antimicrobial cysteine-rich peptide from spider. *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, no. 4, p. 1190-1198.

MANDARD, N.; SY, D.; MAUFRAIS, C.; BONMATIN J.M.; BULET, P.; HETRU, C. and VOVELLE, F. Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1999, vol. 17, no. 2, p. 367-380.

MARCUS, J.P.; GOULTER, K.C.; GREEN, J.L.; HARRISON, S.J. and MANNERS, J.M. Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *European Journal of Biochemistry*, 1997, vol. 244, no. 3, p. 743-749.

MARTEMYANOV, K.A.; SHIROKOV, V.A.; KURNASOV, O.V.; GUDKOV, A.T. and SPIRIN, A.S. Cell-free production of biologically active polypeptides: Application to the synthesis of antibacterial peptide cecropin. *Protein Expression and Purification*, 2001, vol. 21, no. 3, p. 456-461.

MATSUZAKI, K. Why and how peptide-lipid interaction utilized for self defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, vol. 1462, no. 1-2, p. 1-10.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; HUBERT, F. And ROCH, P. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Sciences*, 1999, vol. 112, no. 23, p. 4233-4242.

MORASSUTTI, C.; DE AMICIS, F.; SKERLAVAJ, B.; ZANETTI, M. and MARCHETTI, S. Production of recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters*, 2002, vol. 519, no. 1-3, p. 141-146.

MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; GUEGUEN, Y. And BACHÈRE, E. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, vol. 27, no. 4, p. 283-289.

MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; and BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, no. 45, p. 2678-2689.

NAKAJIMA Y.; VAN DER GOES VAN NATERSYASUI, A.; TAYLOR, D. and YAMAKAWA M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, vol. 31, no. 8, p. 747-751.

NATHAN, C. Catalytic antibody bridges innate and adaptive immunity. *Science*, 2002, vol. 298, no. 5601, p. 2143-2144.

NOVAK, R.; HENRIQUES, B.; CHARPENTIER, E.; NORMARK, S. and TUOMANEN, E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*, 1999, vol. 399, no. 6736, p. 590-591.

OSCÁRIZ, J.C. and PISABARRO, A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, 2001, vol. 4, no. 1, p. 13-19.

OSUKY, M.; ZHOU, G.; OSUSKA, L.; HANCOCK, R.E.W.; KAY, W.W. and MISRA, S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18, no. 11, p. 1162-1166.

OTVOS, L. Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Sciences*, 2000, vol. 6, no. 10, p. 497-511.

PARK, C.J.; PARK, C.B.; HONG S.S.; LEE, H.S.; LEE, S.Y. and KIM, S.C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastor*. *Plant Molecular Biology*, 2000, vol. 44, no. 2, p. 187-197.

PARK, I.Y. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters*, 1998, vol. 437, no.3, p. 258-262.

PARK, C.B.; KIM, H.S. and KIM, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 39, p. 24480-24487.

TANAKA, K. P-I3 - kinase p85 is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras - transformed cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 2001, vol. 92, no. 9, p. 959-967.

TANG, Y.Q.; YUANG, J.; OSAPAY, G.D.; OSAPAY, K.; TRAN, D.; MILLER, C.J.; OUELLETTE, A.J. and SELSTED, M.E. A cyclic antimicrobial peptide produces in primate leukocytes by the ligation of two truncated alphadefensins. *Science*, 1999, vol. 286, no. 5439, p. 498-502.

THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B.; LEMAIRE, K.; WINDERICKX, J.; DICKSON, R.C.; LESTER, R.L.; FERKET, K.K.; VAN EVEN, F.; PARRET, A.H. and BROEKAERT, W. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2000, vol. 97, no. 8, p. 9531-9536.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F.R.G. and BROEKAERT, W.F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no. 12, p. 5451-5458.

TOSSI, A. and SANDRI, L. Molecular diversity in geneencoded, cationic antimicrobials polypeptides. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, vol. 8, no. 9, p. 743-761.

TSAI, H. and BOBEK, L.A. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 1998, vol. 9, no. 4, p. 480-497.

TZOU, P.; REICHART, J.M. and LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2002, vol. 99, no. 4, p. 2152-2157.

UTENG, M.; HAUGE, H.H.; BRONDZ, I.; NISSENMEYER, J. and FIMLAND, G. Rapid two-step procedure for large-scale purification of Pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, vol. 68, no. 2, p. 952-956.

VAN DER BIESEN, E.A. Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends in Plant Sciences*, 2001, vol. 6, no. 3, p. 89-91.

VIZIOLI, J. and SALZET, M. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections? *Trends in Parasitology*, 2003, vol. 19, In press.

VIZIOLI, J., and SALZET, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, vol. 23, no. 11, p. 494-496.

VIZIOLI, J.; BULET, P.; HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; MÜLLER H.M. and DIMOPOULOS, G. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2001, vol. 98, no. 22, p. 12630-12635.

WANG, Y.; GRIFFITHS W.J.; CURSTEDT, T. And JOHANSSON, J. Porcine pulmonary surfactant preparations contain the antibacterial peptide prophenin and a C-terminal 18-residue fragment thereof. *FEBS Letters*, 1999, vol . 460, no. 2, p. 257-262.

WELLING, M.M.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; BALTER, H.S.; PAUWELS, E.K. and NIBBERING, P.H. Tenehtium-99m labeled antimicrobial peptide discriminate between bacterial infection and sterile inflammations. *European Journal of Nuclear Medicine*, 2000, vol. 27, no. 3, p. 292-301.

YAMAUCHI, K. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. *Bulletin IDF*, 1992, vol. 272, no. 1, p. 51-58.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, vol. 415, no. 6870, p. 389-395.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1987, vol. 84, no. 9, p. 5449-5453.

ZHENG, X.L. and ZHENG, A.L. Genomic organization and regulation of three cecropin genes in *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 2002, vol. 11, no. 6, p.517-525.

ZHOU, Q.J.; SHAO, J.Z. and XIANG, L.X. Progress in fish antibacterial peptide research. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2002, vol. 29, no. 5, p.682- 685.

PLANIFICACIÓN ESTRATEGICA

BIOTESIS LTDA.

INDICE

ITEM	Página
1. MISIÓN Y VISIÓN	3
2. OBJETIVOS PRIMER AÑO	3
3. ESTRATEGIAS	4
4. PLANES DE ACCIÓN	4
5. OBJETIVOS DE VENTA	5
6. OBJETIVOS DE RENTABILIDAD	5
7. PUNTO DE EQUILIBRIO	6

1. MISIÓN Y VISION

6.1.- MISIÓN

Transformar rápidamente en negocios las nuevas aplicaciones encontradas para la función antimicrobiana de la molécula descubierta, que estará debidamente protegida mediante patente industrial a nivel nacional e internacional. Licenciar las patentes a nivel internacional y Nacional.

6.2.- VISION

Liderar en Chile la creación de nuevos negocios e industrias con productos innovadores de calidad mundial derivados como aplicaciones de la molécula antimicrobiana descubierta.

2. OBJETIVOS PARA EL PRIMER AÑO

- Objetivo 1:** Poner en marcha la empresa con la primera licencia de explotación comercial de la patente de la molécula antimicrobiana.
- Objetivo 2:** Aplicar mejoras en gestión y operación en un plazo no superior a medio año.
- Objetivo 3:** Montar la planta de producción del producto para proveer a las empresas licenciadas de la molécula antimicrobiana.
- Objetivo 4:** Generar los primeros ingresos significativos durante el segundo año de operación de la empresa con la venta masiva de la molécula antimicrobiana.
- Objetivo 5:** Ingresar al mercado internacional, usando las ventajas competitivas y de Know How técnico para desarrollar nuevos productos a partir de la molécula antimicrobiana patentada.
- Objetivo 6:** Focalizar la búsqueda de Clientes en el extranjero para la entrega de nuevas licencias de patentes.
- Objetivo 7:** Generar estabilidad de ingresos por concepto de licencia de patentes para nuevas aplicaciones.

3. ESTRATEGIAS

- Estrategia 1:** Generar alianzas estratégicas con los propios licenciantes de la patente de aplicación para asegurar la comercialización de la molécula antimicrobiana, mediante el aprovisionamiento exclusivo.
- Estrategia 2:** Disminuir los costos de la gestión a través del uso de la experticia y competencias de los socios productores y comercializadores de los productos finales.
- Estrategia 4:** Crear altas barreras de entrada al negocio, mediante la obtención de la patente de la molécula antimicrobiana y de sus particulares aplicaciones (diversidad de productos).

4. PLANES DE ACCIÓN

- Plan de acción 1:** Atracción de inversionistas para instalarse en los negocios definidos por cada aplicación de la molécula.
- Plan de acción 2:** Implementación de la infraestructura para trabajar en línea con cada nuevo inversionista.
- Plan de acción 3:** Desarrollo e implementación de los Sistemas de Gestión, control y ordenamiento de la empresa.
- Plan de acción 4:** Creación de canales de comercialización con énfasis a la atención de clientes en el extranjero.
- Plan de acción 5:** Búsqueda, aseguramiento de los clientes y FIDELIZACIÓN de clientes.
- Plan de acción 6:** Aseguramiento de la calidad a través de certificaciones del producto entregado.

5. OBJETIVO DE VENTAS

AÑO 1

- Buscar join ventures con países extranjeros para asegurar la producción e intercambio tecnológico.

AÑO 2

- Iniciar el proceso de Exportación de péptidos

6. OBJETIVO DE RENTABILIDAD

	RI %	RV %
AÑO 1		
AÑO 2		
AÑO 3		
AÑO 4		
AÑO 5		
AÑO 6		
AÑO 7		
AÑO 8		
AÑO 9		
AÑO 10		

RI = Ingreso / Inversión

RV = UTILIDAD NETA / VENTAS

VAN: \$117.229.309

TIR: 23%

16. PUNTO DE EQUILIBRIO (P.E.)

	PE \$
AÑO 1	
AÑO 2	
AÑO 3	
AÑO 4	
AÑO 5	
AÑO 6	
AÑO 7	
AÑO 8	
AÑO 9	
AÑO 10	

PLAN DE NEGOCIOS

BIOTESIS LTDA.

INDICE

ITEM	Página
8. DESCRIPCIÓN DEL NEGOCIO	3
9. PRODUCTOS Y SERVICIOS	4
10. MERCADO OBJETIVO Y SEGMENTACIÓN.....	5
11. PROCESOS	6
12. CANALES DE COMERCIALIZACIÓN	7
13. ANÁLISIS FODA.....	8
14. VENTAJAS COMPARATIVAS.....	9
15. PARTICIPANTES DEL MERCADO	10
16. ANÁLISIS DEL ENTORNO	11

1. DESCRIPCIÓN DEL NEGOCIO

Biotesis Ltda. estará orientada a satisfacer necesidades empresariales de desarrollo de nuevos productos en base a péptidos antimicrobianos y a licenciar estos productos derivados y proveer esta materia prima para la fabricación masiva en la industria farmacéutica, cosmética y sanitaria.

Biotesis Ltda. aportará como valor agregado el respaldo de instituciones tecnológicas, universidades y especialistas.

2. PRODUCTOS Y SERVICIOS

Existen dos líneas de negocio:

2.1.- LICENCIAMIENTO DE PATENTES DE PRODUCTOS PEPTIDICOS DERIVADOS

Comercialización de licencias de explotación productiva y comercial de nuevos productos concebidos, diseñados y desarrollados en base al uso de péptidos antimicrobianos.

2.2.- FABRICACION Y COMERCIALIZACION DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Fabricación y comercialización de péptidos antimicrobianos para abastecer empresas beneficiarias de las licencias de explotación productiva y comercial entregada por Biotesis Ltda..

3. MERCADO OBJETIVO Y SEGMENTACIÓN

Estos a nivel general pueden ser clasificados por origen del cliente en dos grandes ítems con subclasificaciones:

Mercado Nacional

- Licencias de patentes de productos peptídicos
 - Inversionistas
 - Grandes empresas
 - Empresas manufactureras
- Fabricación y comercialización de péptidos antimicrobianos
 - Empresas farmacéuticas
 - Empresas del rubro cosmético
 - Empresas manufactureras

Mercado Internacional

- Licencias de patentes de productos peptídicos
 - Inversionistas
 - Grandes empresas
 - Empresas manufactureras
- Fabricación y comercialización de péptidos antimicrobianos
 - Empresas farmacéuticas
 - Empresas del rubro cosmético
 - Empresas manufactureras

PAISES

- España
- Europa en general
- Estados Unidos
- Países asiáticos

4. PROCESOS

4.1.- DESARROLLOS PROPIOS DE PRODUCTOS Y PROCESOS PARA OBTENCION DE PATENTES Y SU INDUSTRIALIZACIÓN

La concepción, diseño y desarrollo de nuevas aplicaciones de los péptidos antimicrobianos se efectuarán en conjunto con CT Valparaíso S.A. En cada etapa se acumula un conocimiento técnico, se efectúa un proceso de gestión creativa previa, para luego desarrollar conceptos de diseño de productos, así como el desarrollo formal del mismo. Luego de haber realizado las pruebas precomerciales y comprobado su aceptación en el mercado, se procede a solicitar la patente industrial, la que posteriormente será licenciada a terceros para su explotación productiva y comercial.

4.2.- PRODUCCION DE PEPTIDOS

La producción masiva de péptidos se realizará mediante una planta de fabricación de la propia empresa.

5. CANALES DE COMERCIALIZACION

5.1.- LICENCIA DE EXPLOTACION DE PRODUCTOS PEPTIDICOS

Las licencias de explotación comercial de las patentes de nuevos productos las realizará Biotesis Ltda. en conjunto con CT Valparaíso S.A.

A nivel nacional, junto con entregar licencias, se centrarán esfuerzos en empresarizar los nuevos productos con el objeto de instalar operaciones productivas en el propio país.

5.2.- DISTRIBUCION DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Comercialización mediante distribuidores autorizados por Biotesis Ltda., tanto a nivel nacional como internacional.

6. ANÁLISIS FODA

7.1.- FORTALEZAS

1. Si Biotesis Ltda.. se localiza en Valparaíso, queda ubicada cerca de Santiago y diversas unidades de investigación nacionales.
2. Nivel de experticia y competencia científica, técnica y de gestión en transferencia tecnológica de los socios fundadores de la empresa (know how)
3. Operaciones de desarrollo tecnológico a nivel nacional e internacional.
4. Procesos y procedimientos con resultados concretos.
5. Mecanismos de salida definidos y controlados.

7.2.- OPORTUNIDADES

1. Posibilidades de concepción, diseño y desarrollo de nuevos productos a bajo costo por instalarse la empresa en una región con diversidad de grupos de investigación especializados y accesibles a solicitudes de trabajo contratado.
2. Explotación del potencial de negocios otorgado por la experticia científica, técnica y en transferencia tecnológica de los socios fundadores de la empresa (know how).
3. Vías expeditas para instalar operaciones de desarrollo tecnológico a nivel nacional e internacional, a través de la cercanía con la Pontificia UCV y de CT Valparaíso S.A., que junto a otros socios, darán origen a esta nueva empresa biotecnológica.
4. Posibilidades de concretar con productos innovadores en el mercado.
5. Salida del negocio rápida debido a que el valor de la empresa está mayoritariamente en su Know How y menos en el tamaño de las inversiones en activos fijos.
6. Participación activa en el desarrollo de la industria biotecnológica en Chile.

7.3.- DEBILIDADES

1. Lejanía de la ubicación de la demanda (Europa, Asia y norte América)
2. Escaso nivel de consumo nacional
3. Conocimiento nulo en el mercado nacional

7.4.- AMENAZAS

1. Existencia el mercado europeo de otras empresas con mayor know how
2. Mayor organización de otros países exportadores para cubrir el mercado internacional
3. Expansión de países exportadores tradicionales
4. Poca experiencia en Chile sobre el conocimiento de este rubro
5. Alto Interés por esta actividad comercial en Chile
6. Nula credibilidad en tecnologías chilenas en el extranjero y en el propio país.
7. Venta de licencias de patentes industriales no catalogadas en el sistema armonizado de exportaciones.

8. VENTAJAS COMPARATIVAS

- know how biotecnológico y específicamente en producción peptídica
- Respaldo de unidades científicas universitarias y de un centro de transferencia tecnológica
- Operaciones con grupos de científicos nacionales y extranjeros
- Capacidad Instalada de la PUCV y de CT Valparaiso S.A., destacando sus operaciones nacionales e internacionales en el ámbito biotecnológico y de la transferencia tecnológica.
- Experiencia previa en este ámbito biotecnológico de los gestores del negocio.

12 . PARTICIPANTES DEL MERCADO

El atractivo de la industria es medio-alto

BARRERAS A LA ENTRADA

NIVEL MEDIO – ALTO

- Niveles de inversión: **medio**
- Marcas: **Alto**
- Volúmenes de venta: **medio**
- Calidad del proceso: **alto**
- Frecuencia De Demanda: **media**

PODER CLIENTES

Medio

Finales e Intermediarios

Competencia

NACIONAL: Baja

INTERNACIONAL: alta

PODER PROVEEDORES

Alto

Unico proveedor de licencia de patente del péptido antimicrobiano, que puede otorgar exclusividad o no

SUSTITUTOS

Medio

Mercado nacional e internacional: productos farmacéuticos, cosméticos y sanitarios
Mercado Internacional:

13. ANÁLISIS DEL ENTORNO

1. VARIABLES DEL ENTORNO

- Político: Estabilidad política chilena atractivo para los mercados extranjeros y es uno de los pocos países estables en Latinoamérica
- Legal: TLC disminuye una serie de barreras
- Económico:
 - Dólar en baja pero permite competitividad
 - TLC Favorecen en exportaciones
 - Desarrollo emergente del mercado de la empresarización de nuevas ideas de negocio, así como del licenciamiento de patentes industriales
 - Favorable escenario para la transferencia tecnológica en Chile
 - Favorable escenario para propiciar la industria biotecnológica en Chile

2. AVANCES TECNOLÓGICOS

Política fiscal para entregar al empresario chileno mejor nivel competitivo a nivel internacional.