



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO BIOQUÍMICO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DEL MODELO DE ACCIÓN MEMBRANAL PARA UN PEPTIDO LASSO.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Edson Edinho Robles Gómez

Dr Manuel Soriano García
Investigador Tiempo Completo
Instituto de Química

MEXICO D.F, DICIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO BIOQUÍMICO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DEL MODELO DE ACCIÓN MEMBRANAL PARA UN PEPTIDO LASSO.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Edson Edinho Robles Gómez

Dr Manuel Soriano García
Investigador Tiempo Completo
Instituto de Química



MEXICO D.F, DICIEMBRE DE 2015

Artículos Publicados

Edinho Robles-Gomez, Edson; Citlali Flores-Villegas, Mirelle; Gonzalez-Manjarrez, Alicia; Soriano-Garcia, Manuel (2013). Structural analysis as an alternative to identify and determine mode of action of antimicrobial peptides: proposition of a kinetic model based on molecular dynamics studies. *Protein. pept. lett.* 20(5):489-498

Artículos en construcción

Edinho Robles-Gomez, Edson; Citlali Flores-Villegas, Mirelle; Gonzalez-Manjarrez, Alicia; Arreguin Roberto, Soriano-García, Manuel. Protein-centric genome mining for the identification of the sroACB1B2D homologs, and purification of the SRO15-2005 peptide. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. Under revision.

Edinho Robles-Gomez, Edson; Citlali Flores-Villegas, Mirelle; Gonzalez-Manjarrez, Alicia; Soriano-Garcia, Manuel. Cyclization of a cationic Peptide: Effect on Interaction with Model Membranes, and Biological Function. Writting process.

Estancia:

Universidad de Lund. Department of Biology, Molecular Biology, Faculty of Science. Suecia. En el periodo 2012 (Septiembre-diciembre) y 2013 (Abril-Septiembre) a cargo del profesor Jure Piskur.

Congresos:

QUIMIUNAM *S. roseosporus* codes for a lasso peptide. (2015).

Calidad: Ponente

Simposio interno con motivo del Homenaje Dr. Alfonso Romo de Vivar. Biosíntesis y estructura del péptido Lasso SRO-16 de *S. roseosporus*. (2014).

Calidad: Ponente

Congreso Alumnos de Posgrado. Identificación de un nuevo péptido antimicrobiano 1F9R⁽⁵⁷⁻⁷⁰⁾ determinación de actividad antimicrobiana y modelo de acción. (2013).

Calidad: Poster.

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Manuel Soriano en el laboratorio 2 del Departamento de Biomacromoléculas del Instituto de Química.

A la UNAM que junto con sus investigadores, estudiantes y administrativos me acompañaron y apoyaron en las diferentes etapas de este trabajo, a México y de nuevo a la UNAM un merecido reconocimiento por su generosidad, confianza y apoyo, que me permitió llevar a cabo este trabajo, ofreciéndome además la posibilidad de crecer en el campo académico y personal. A CONACYT por su apoyo permitiéndome ser beneficiario de su programa de becas con el número 240061, porque sin éste el proyecto no hubiera sido viable.

Al finalizar un trabajo de doctorado es inevitable sentir algo de egocentrismo que te lleva a acreditarse todas las victorias experimentales y humanas que has conseguido en este periodo. Sin embargo, un análisis objetivo te muestra inmediatamente que sin la participación de compañeros, administrativos e instituciones académicas, este trabajo sería olvidado. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi agradecimiento. Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Manuel Soriano por aceptarme para realizar esta tesis doctoral. A la Dr. Alicia Gonzales del Instituto de fisiología de la UNAM, su confianza en mí, apoyo intelectual y personal, que han sido un aporte invaluable, que no podré olvidar jamás. Al Dr. Jure Piskur porque con su combinación de sentido del humor, generosidad y capacidad intelectual, se convirtió en un modelo a seguir. A los sinodales de mi trabajo que a sus correcciones, en donde me han mostrado que una tesis significa mucho más que un reporte y es el soporte documentado de una investigación, en especial al Dr. Enrique García y Dr. Miguel Costas que con sus consejos mejoraron mi trabajo; a la Dr. Nuria por sus muy objetivas, acertadas y detalladas correcciones; a la Dr. Bertha y Dr. Francisco por su aporte, disposición y amabilidad; por ultimo al Dr. Federico quien con su amabilidad y disposición han mejorado esta tesis. A mis compañeros de laboratorio que debieron soportar mi extraño sentido del humor, despiste y demás locuras que día a día sobrevuelan en mi cabeza. Este último párrafo que debería ser el primero es para mi esposa Citlali Flores. Describir lo que ella ha aportado a este trabajo es imposible, su enorme paciencia, cariño, ternura y su contribución intelectual en las áreas de bioinformática y biología molecular es indescriptible. En esta tesis estamos juntos desde la primera palabra hasta la última y espero que ella me permita estar a su lado hasta cuando yo pueda pronunciar mi última letra. Por ultimo el patrocinador oficial para la cual soy perfecto: Mi madre.

RESUMEN

La mayoría de los modelos cinéticos que describen el fenómeno de interacción péptido-membrana plantean sus ecuaciones diferenciales en función de la liberación de un fluoróforo embebido en una vesícula sintética. Sin embargo, existen péptidos que tienen actividad membranal sin llegar a la formación de poros, por lo tanto surge la necesidad de plantear un modelo cinético aplicable a estos péptidos. El Capítulo I plantea un modelo cinético que responde a la problemática mencionada y utiliza un parámetro relacionado con fenómenos superficiales. El modelo fue examinado con el péptido 1F9R y su interacción con vesículas sintéticas. Los resultados obtenidos son satisfactorios y el modelo describe con precisión el fenómeno de interacción y se concluye que el cambio conformacional del péptido es fundamental para la interacción. Una nueva etapa en la investigación surgió a partir de esta conclusión y he intenta responder la siguiente pregunta ¿Es el modelo cinético capaz de discernir entre péptidos restringidos estructuralmente de los que no lo son? Para responder a esta pregunta se planteó una estrategia experimental que consistió en evaluar la interacción de un péptido catiónico de origen natural con impedimento estérico y uno de misma secuencia sin impedimento frente a vesículas sintéticas. En el capítulo II se purificó y caracterizó un péptido Lasso SRO15-2005 de *Streptomyces roseosporus* por su rigidez estructural y un péptido lineal con la misma secuencia del SRO15L-2005. Por último, en el capítulo III se estudiaron variaciones en la isoterma de interacción entre el péptido SRO15-2005, SRO15L-2005 y vesículas sintéticas. El modelo cinético planteado reproduce el comportamiento para los dos péptidos y apoya la idea de que: la formación de multicapas en la superficie de la vesícula es el paso inicial para la formación de poros y es lograda por péptidos capaces de tener cambios estructurales.

ABSTRACT

Peptide-membrane interaction models are based on the release of a fluorophore embedded in a synthetic vesicle. However, there are membrane active peptides that do not release a fluorophore and therefore are not applicable to this models. In chapter I we developed an experimental strategy and a kinetic model for the peptide 1F9R with antimicrobial activity that does not generate pores in the membrane. The satisfactory results are described with good accuracy of the interaction phenomena. However, it was necessary to include the conformational change of the peptide to understand the 1F9R peptide membrane interaction. From the above, a new question arose: How susceptible is the kinetic model to conformational changes of a peptide with membrane activity? The experimental design to solve this question was based on evaluating the performance of a peptide, with a hindered conformational change and with a different sequence, against synthetic vesicles. In chapter II we described the purification characterization of a lasso peptide (SRO15-2005) that met the above requirements. The results show that the adsorption isotherms in liquid phase and the proposed kinetic model can describe the phenomenon and support the idea that the formation of multilayers (which behave like a condensed phase or agglomerates) is the initial step in pore formation (Chapter III). Finally, the results for the lasso peptide allow us to hypothesize that steric hindrance is an evolutionary tool to optimize and diversify peptide function.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras y tablas

Introducción General..... 1

Materiales y métodos generales.....4

| | |
|---|----|
| 1. Minería genómica | 4 |
| 2. Cepas, plásmidos, y medios de cultivo utilizados | 4 |
| 3. Expresión endógena | 5 |
| 4. Estabilidad térmica y proteasa ensayo | 5 |
| 5. Purificación de SRO15-2005 por expresión endógena | 5 |
| 6. Análisis de espectrometría de masas | 6 |
| 7. Clonación del grupo biosintético SroACBD | 6 |
| 8. Ingeniería del grupo biosintético y mutaciones puntuales | 7 |
| 9. Inducción del grupo y purificación de SRO15-2005 y variantes | 7 |
| 10. Dicroísmo circular | 8 |
| 11. Curvas de crecimiento | 8 |
| 12. Escape de calceína | 9 |
| 13. Isotermas de adsorción sobre vesículas | 9 |
| 14. Dinámica molecular | 10 |
| 15. Dinámica molecular aplicada a péptidos Lasso | 10 |
| 16. Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 10 |
| 17. Péptidos sintéticos | 11 |
| 18. Bibliografía. | 11 |

Capítulo I.

DISEÑO DE UN NUEVO MODELO CUANTITATIVO DE INTERACCIÓN PÉPTIDO-VESÍCULA.

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 12 |
| 1.1 Descripción de modelos de Interacción entre péptidos y membranas celular | 14 |
| Adsorción de los péptidos en la membrana | 14 |
| Afinidad de péptidos anfipáticos primarios por vesículas | 15 |
| Afinidad de péptidos anfipáticos secundarios por vesículas | 16 |
| Afinidad de péptidos anfipáticos policatiónicos por vesículas | 17 |
| Estructuras supramoleculares y agregación | 18 |
| Modificación de la membrana inducida por péptidos | 18 |
| Reorganización lipídica | 18 |
| Formación de poros y alteración de la dinámica flip-flop de los lípidos | 18 |
| 1.2. Características generales de péptidos perturbadores de membrana | 19 |
| Conformación | 20 |
| Carga (ω) | 20 |
| Hidrofobicidad (H) | 20 |
| Helicidad (Ψ) | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3 Modelos cinéticos de cuantitativos de interacción péptido-membrana | 21 |
| Modelo Cinético de interacción para la δ -lisina sobre vesículas sintéticas | 21 |
| Modelo Cinético para el Transportan 10 | 23 |
| Modelo cinético de la Cecropina A | 24 |
| 2. Planteamiento del problema | 26 |
| 3. Hipótesis | 27 |
| 4. Estrategia experimental | 28 |
| 5. Resultados y discusión | 29 |
| 5.1 Modelo cinético | 28 |
| Formulación matemática | 29 |
| Simulación numérica de las ecuaciones planteadas en el modelo cinético | 32 |
| 5.2 Diseño del péptido prueba | 33 |
| 5.3 Análisis del comportamiento del péptido | 34 |
| Ensayos de liberación de calceína | 34 |
| Actividad antimicrobiana | 35 |
| Modelo cinético | 35 |
| 5.4 Dinámica molecular | 40 |
| 6. Conclusiones | 42 |
| 7. Bibliografía | 42 |

Capítulo II

EN BUSCA DE UN PÉPTIDO ESTRUCTURADO Y CON CARACTERÍSTICAS DE PÉPTIDO CATIONICO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 46 |
| 1.1 Productos Naturales | 47 |
| Aislamiento de productos naturales y una breve introducción a la minería genómica | 48 |
| Péptidos ribosomales y no-ribosomales | 49 |
| Algunas modificaciones post-traduccionales de péptidos ribosomales | 50 |
| Péptidos ribosomal macrocíclicos | 52 |
| Bacteriocinas circulares | 52 |
| Cyanobactinas | 53 |
| Defensinas | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2 Péptidos lasso | 54 |
| Descubrimiento | 54 |
| Características generales | 55 |
| Estructura y clasificación de los péptidos Lasso | 55 |
| Biosíntesis de péptidos Lasso | 58 |
| Purificación de péptidos Lasso | 59 |
| Biología molecular en péptidos Lasso | 61 |
| Actividades biológicas | 62 |
| Estudios genómicos para obtención de péptidos Lasso | 63 |
| Homología y minería genómica | 63 |
| Minería genómica con base en el precursor | 64 |
| Minería genómica guiada por espectrometría de masas | 64 |
| Contribuciones de la minería genómica | 65 |
| 2. Planteamiento del problema | 66 |
| 3. Diseño Experimental | 66 |
| 4. Resultados | 67 |
| 4.1 Minería genómica centrada en genes homólogos de B | 67 |
| 4.2 Expresión endógena del péptido SRO15-2005 | 68 |
| 4.3 Expresión heteróloga de la SRO15-2005 Péptido | 71 |
| 4.4 Determinación de la topología Lasso del SRO15-2005 por métodos bioquímico | 72 |
| 4.5 Identificación de los residuos relevantes para el plegamiento tipo Lasso: Dinámica | 73 |
| 4.6 Variantes en Arg13 y Arg 14 | 75 |
| 4.7 Efecto del cambio en la densidad de carga del anillo macrolactámico en la estabilidad | 77 |
| 5. Discusión | 77 |
| 6. Conclusiones | 79 |
| 7. Bibliografía | 80 |

Capítulo III

DETERMINACIÓN DEL MODELO INTERACCIÓN DE MEMBRANA PARA UN PÉPTIDO CON

RESTRICCIONES CONFORMACIONALES (PÉPTIDO LASSO) Y UN PÉPTIDO ALEATORIO CON LA MISMA ESTRUCTURA PRIMARIA.

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 1. Introducción | 84 |
| 2. Estrategia experimental | 84 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Resultados | 85 |
| Flujo de calceína | 85 |
| Isotermas de adsorción en fase líquida | 85 |
| Efecto en el cambio de carga del péptido | 85 |
| Evaluación del cambio estructural por TFE | 87 |
| Asegurando la reversibilidad de la reacción | 89 |
| Estabilidad de las vesículas y el péptido | 90 |
| Actividad antimicrobiana | 90 |
| Obtención de las constantes cinéticas usando el modelo cinético planteado | 90 |
| | |
| 4. Discusión | 92 |
| | |
| 5. Conclusiones | 93 |
| | |
| 6. Bibliografía | 94 |

I. APENDICE CAPITULO I

II. APENDICE CAPITULO II

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1.1 Mecanismos de interacción de péptidos. Se pueden dividir en diferentes fenómenos, todos ellos promueven una inserción del péptido en la membrana.

Figura 1.2. Mecanismos de Acción. Afinidad, estructura e inserción de péptidos anfipáticos primarios, secundarios y poli catiónicos.

Figura 1.3 Mecanismos de perturbación de membrana.

Figura 1.4. Características fisicoquímicas determinadas para los péptidos antimicrobianos. Alameticina, Magainina2 (MG) y KLAL. Los grupos cargados positivamente se muestran en color negro y los hidrofílicos de color gris. También se reportan las propiedades como tamaño (N), Hidrofobicidad (H), momento hidrofóbico (μ) y Ángulo polar (ϕ) (9).

Figure 1.5 Representación gráfica de la distorsión de la membrana. Por péptidos de bajo peso molecular establecidas a partir del modelo cinético planteado para la δ -Lysin [50].

Figura 1.6 Modelo de interacción entre la cecropina A y vesículas sintéticas. A: P_w cecropina no estructurada en medio acuoso; B: P_{Full} , cecropina enlazada y plegada en vesículas llenas de fluoróforo; C: P^* ; cecropina en un poro; D: P_{Emp} , cecropina enlazada con vesículas vacías de fluoróforo [52].

Figura 1.7 Modelo de teorico. A. Comportamiento ideal de la membrana donde todo el péptido ocupa los sitios libres y el valor de θ es igual a uno. Las flechas indican posición en disponibles y los círculos son los péptidos que se B. Internalización de péptidos en el espacio intermembranal.

Figura 1.8 Simulación numérica de la cantidad de péptido adsorbido en función del tiempo con base en el modelo establecido en este proyecto. Cuando la constante de adsorción k_f es muy grande podemos establecer tres escenarios: **1.** -●- los valores de las constante es $B = 0.5$, $G = 0.03$, $k = 2.3 \text{ s}^{-1}$. **2.** -□- los valores de las constante es $B = 0.5$, $G = 0.03$, $k = 0.3 \text{ s}^{-1}$. **3.** -x- los valores de las constante es $B = 0.5$, $G = 0.03$, $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$. Las curvas fueron simuladas en un programa basado en DLSODE Fortran 77 y Origin 5.0.

Figura 1.9 Porcentaje de alfa hélices de los péptidos seleccionados por interacción con TFE. El resultado muestra que 1F9R tiende a la formación de alfa-hélice en mayor grado que los péptidos 1O7Y y 1NAP.

Figura 1.10 Porcentaje de calceína liberada por acción del péptido 1F9R a diferentes concentraciones. La grafica de lado derecho muestra la interacción péptido con LUVs de composición similar a las membranas de mamífero. La gráfica izquierda muestra la interacción del péptido con LUVs de composición a las membranas de bacteria. En ninguna de estas gráficas se muestra que el péptido pueda perturbar la membrana.

Figura 1.11 Porcentaje de supervivencia de diferentes organismos contra el 1F9R A. *E.coli* B. *S. cerevisiae*; en ellos se observa un efecto bacteriostático (El crecimiento se restablece) C *C. glabrata* D CFU (Unidades formadoras de colonias vs concentración de péptido) para *C. glabrata*; los resultados muestran que el péptido inhibe el crecimiento. Los marcadores representan las diferentes concentraciones utilizadas (-●-) 0.22 mg/mL of péptido. (-○-) 0.44 mg/mL de péptido. (-■-) 0.66 mg/mL de péptido. (-□-) 0.88 mg/mL de péptido.

Figura 1.12 Microscopía electrónica. Donde A, C y D son los controles (sin interacción con péptido) de los organismos A. *E.coli* B. *S. cerevisiae* C. *C glabrata*. Las figuras B, D y F muestran el efecto por interacción con el péptido 1F9R a una concentración de 0.300 mg/mL. Se observa lisis celular y formación de biofilm.

Figura 1.13 Isoterma de adsorción del péptido 1F9R sobre vesículas de PE (fosfatidiletanolamina) y Adsorción del péptido en función del tiempo sobre vesículas PE. Los puntos son los datos experimentales y la línea representa los datos teóricos basados en el modelo. **A.** Isoterma de adsorción donde Q concentración de péptido adsorbida (Concentración inicial - Concentración final) y C_{eq} es la concentración en solución. **B.** Cantidad de Péptido adsorbida en función del tiempo. Se observa que existe un equilibrio dinámico entre el péptido adsorbido y el péptido en solución (Debido a que siempre existe una concentración remanente sin importar que el tiempo pase), por último la forma de la isoterma nos dice que tiene un comportamiento similar a una isoterma de Langmuir.

Figura 1.14 Dinámica molecular del péptido seleccionado 1F9R. (A-B) Fotografías del péptido a 10ns y 50 ns. **C.** Forma de enlace del péptido a la membrana. (D-E) Superficie de interacción péptido-lípido. (F) Parámetro de orden de las cadenas lipídicas.

Tablas capítulo 1

Tabla 1.1 Péptidos ampliamente estudiados donde se destaca su carga y conformación al interactuar con membranas lipídicas (EPIPL).

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de proteínas que se agrupan en la secuencia consenso (APXIKKIIKKXLX) helicidad, carga, punto isoeléctrico, momento hidrofóbico

Tabla 1.3 Constantes de Desorción y Adsorción para vesículas tipo mamífero y bacteria. Los valores obtenidos están lejos de los valores propios difusión simple que se muestran en otros modelos; esto indica que el valor de estas constantes depende del modo de acción del péptido y otros parámetros fisicoquímicos.

Capítulo II

Figura 2.1 Propiedades generales de los péptidos ribosomales

Figura 2.2 Posibilidades de formación del anillo de macrolactama. La condensación puede tener lugar en diferentes lugares.

Figura 2.3. Síntesis de la Subtilisin. A. Grupos de genes biosintéticos que codifican a la subtilisin A, enzimas de procesamiento están en azul; los genes que confieren auto- inmunidad se muestra en verde. Los genes de función desconocida se destacan en color gris. B. Biosíntesis.

Figura 2.4 Síntesis de la Petelamida A y C. Grupos de genes biosintéticos están en azul. Los genes de función desconocida se destacan en color gris. Las secuencia de la patelamida A y C están en letras rojas, las letras subrayadas son los aminoácidos que flanquean y no pertenecen a la secuencia final es decir son eliminados por proteólisis.

Figura 2.5 Propiedades de las Θ -Defensinas. Caracterizadas por tener hojas paralelas unidas por puentes disulfuro.

Figura 2.6 Péptido Lasso conformacion general. Un C-terminal atrapado en el anillo de macrolactama.

Figura 2.7. Estructura de la Microcin J25. Se observa que el impedimento estérico es obtenido a través de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

Figura 2.8 Genes precursores de la biosíntesis del péptido Lasso MccJ25. El *mcjA* codifica para el péptido líder, *mcjB* es la péptidasa, *mcjC* es la asparagino sintetasa y *mcjD* es el transportador ATP.

Figura 2.9. Ejemplo de un espectro de masas para un péptido Lasso capistruina. El péptido es fragmentado, obteniendo las series *b* y *y* correspondientes. Observe que fragmentaciones en el anillo no se observan.

Figura. 2.9A. Tipos diferentes de organización de genes en la biosíntesis de péptidos Lasso. A). Tres organizaciones características en los péptido Lasso. B) Algunas características de genes adacentes al clúster biosintético.

Figura 2.10. Arbol filogenético de los grupos biosintéticos obtenidos por minería genómica. Árbol filogenético basado en los grupos biosintéticos identificados en el phylum de Actinobacteria. La identificación de cuatro clados fue realizada, el primero un péptido es altamente conservado. En negro es el péptido precursor, azul homólogos de Asparagino sintetasa, en rojo homólogos de Transglutaminasa, en verde el ABC transportador y en gris el gen PqqD.

Figura 2.11 Alineamiento de los péptidos Lasso pertenecientes al clado I. Se muestra una secuencia conservada, con pocas modificaciones. Los asteriscos significan posiciones conservadas.

Figura 2.12. Expresión endógena. A). Cromatograma obtenido para la expresión endógena. B) y C) MALDI para los péptidos con un tiempo de retención de 19.80 min y 21.12 min respectivamente.

Figura 2.13. Expresión heteróloga y Topología del péptido SRO15-2005. A). El grupo biosintético del SRO15-2005. B). Expresión heteróloga sobre el plásmido pNIC-sroArCBIB2D C). Cromatograma fase obtenida para un sistema en RP-HPLC fase reversa en un sistema escalonado (La concentración de B (acetonitrilo-0.1% TFA incrementa linealmente de 0%-30% en 15 min y de 30%-35 en 10 min en la columna The Hibar 250, c18, 4-6) donde se obtuvo dos péptidos con misma masa péptido A, y péptido B y concordante con la masa del SRO152005; un tercer péptido con masa superior a la calculada por 18 Da. D) Espectro MS² para los péptidos obtenidos obteniendo el mismo patrón de fragmentación y diferente tiempo de retención. E) Tratamiento térmico donde se observó que solo un péptido tubo cambio su tiempo de retención por efecto del tratamiento, indicando posible topología Lasso F) Tratamiento con carboxypeptidasa después del tratamiento térmico lo que permitió establecer que el péptido con tiempo de retención 19.69 tiene topología Lasso.

Figura 2.14. Comparación de parámetros de orden de los modelos CM1 a CM5 obtenidos por dinámica molecular. El primer panel muestra la variación de puentes de hidrogeno pertenecientes a la cadena del péptido. El segundo panel es la distancia en nm de la tirosina y triptófano uno perteneciente al anillo y otro al C-terminal. Por último el tercer panel es el RMSD de cada uno de los modelos. Los resultados muestran que cuando se utiliza a las Argininas como residuo de estabilización. El sistema mantiene su conformación tipo Lasso, si se utilizan otros residuos del C-terminal esto no ocurre o se alcanzan conformaciones espaciales no congruentes.

Figura 2.15 Purificación y estabilidad de las variantes R13L y R14L. Tratamiento térmico para las variantes R13L y R14L. A) y B) Patrón de fragmentación MS² para las variantes R13L y R14L, respectivamente. C) y D) Perfil cromatográfico antes y después del tratamiento térmico para R13L y R14L respectivamente. E) y F) perfil cromatográfico obtenido con el tratamiento de la carboxypeptidasa Y. Los resultados muestran la importancia de las dos argininas 13 y 14 y los puentes salinos en la estabilidad de la topología Lasso.

Tablas capítulo 2

Tabla 2.1 Información general de las modificaciones postraduccionales de péptidos ribosomales.

Tabla 2.2. Péptidos Lasso reportados hasta el momento

Capítulo III

Figura 3.1 Flujo del calceína a diferentes concentraciones de lípido (POPC LUV) 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfolina cuando se puso en contacto con 10 μM de SRO15L-2005 (Tres repeticiones). Las curvas corresponden a diferentes concentraciones de lípido A) 50 μM ; B) 100 μM ; C) 150 μM ; D) 300 μM ; E) 500 μM ; F) 700 μM ; G) 1000 μM , H) 2000 μM . Los resultados demuestran que la liberación total de la calceína se alcanza a menor concentración de lípido es decir a altas concentraciones de péptido en comparación del péptido. A 2000 μM el péptido ya no puede formar poros en la membrana

Figura 3.2 Flujo del calceína desde LUV compuestas por 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfolina 50 μM cuando se puso en contacto con 10 μM del péptido Lasso SRO15-2005. Los resultados demuestran que no hay liberación de calceína a ninguna concentración de lípido.

Figura 3.3 Isotermas de adsorción. A).Isoterma de adsorción del péptido Lasso B) Isoterma de Adorcion de los péptidos lineales SRO15L-2005, R14L, R14LR13L, K8L/R13L/R14L. EL comportamiento observado demuestra que las vesículas adsorben el peptido Lasso hasta una concentracion limite, caso contrario para el peptido lineal, ode la vesícula puede adsorber mucho mas; esté comportamiento puede ser explicado asumiendo que existe una formacion de multicapas de peptido lineal en la superficie de la mebrana.

Figura 3.4 Porcentaje de hélicidad en función de la concentración de TFE. Los resultados demuestran que los péptidos lineales sintéticos tienden a la formación de alfa hélices a medida que el porcentaje de TFE, lo que indica que cuando el péptido es sometido a un ambiente limitado en moléculas de agua tiende a adquirir la conformación alfa-hélice. Con respecto al péptido lasso el porcentaje de hélicidad no cambia debido a su impedimento estérico

Figura 3.5 Reversibilidad del fenómeno de adsorción a Altas concentraciones (300 uM) y Bajas concentraciones (100 uM). El comportamiento indica que el péptido adsorbido en las vesículas sin calceína se desorbe y ataca a las vesículas con calceína, asegurando la reversibilidad del fenómeno. La velocidad de liberación de calceína indica que a concentraciones elevadas el sistema genera una fase condensada en la superficie que puede desorberse fácilmente y a concentraciones bajas de péptido este queda adsorbido.

Figura 3.6 Aplicación del modelo cinético a los datos obtenidos para los péptidos lineales. Los puntos son los datos experimentales y las líneas son los modelados. Como se puede observar los datos teóricos y experimentales concuerdan desde un 96% a un 99%.

Tablas capítulo III

Tabla 3.1. Secuencias utilizadas para determinar el efecto estructural y de carga.

Tabla 3.2 Actividad antimicrobiana para los diferentes péptidos obtenidos. Los valores reportados es la concentración mínima inhibitoria

Tabla 3.3 Parámetros obtenidos a partir del modelo cinético.

Introducción general

Desde su descubrimiento en el siglo 20, los antibióticos han aumentado la esperanza de vida de los humanos, especialmente desde la revolución industrial [1]. Sin embargo, la aparición y propagación de cepas resistentes a los antimicrobianos en las últimas décadas, exige el desarrollo de nuevos agentes para combatir este fenómeno natural. Un gran número de los antibióticos actuales están basados en las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos. Esto es debido a que los organismos tienen una biblioteca molecular que es continuamente rediseñada por librerías genómicas que evolucionan rápidamente.

El entender las propiedades comunes de estos metabolitos secundarios como: estructura, composición, y actividad antimicrobiana han permitido plantear una serie de parámetros fisicoquímicos necesarios para que una molécula puede tener actividad antimicrobiana [2]. Desafortunadamente, el diseño de un novedoso antimicrobiano sujeto a estos parámetros, no aseguran su actividad; por el contrario en la mayoría de los casos estas moléculas no cumplen con los objetivos iniciales. Esto ocurre porque la interacción de estas moléculas frente a un organismo es muy compleja y es afectada por muchos factores que se toman en consideración cuando se diseña una molécula antimicrobiana [2].

Existen, en general, dos rutas de interacción que usan los antimicrobianos para ejercer su actividad: la primera, afecta directamente a la membrana del patógeno y la segunda tiene como objetivo una molécula o complejo intracelular que participa en el metabolismo constitutivo de la célula [3]. La interacción del péptido con la membrana es estudiada con vesículas fácilmente sintetizadas en el laboratorio con composición similar a las de los patógenos estudiados [4]. La segunda ruta es mucho más compleja de estudiar, debido a que es necesario identificar cuál ruta metabólica está siendo afectada y específicamente a que proteína perturba el antimicrobiano [5]. Esta tarea es complicada por la gran cantidad de procesos constitutivos que una célula realiza.

Aunque existen muchos tipos de antimicrobianos en el mercado, nosotros nos enfocamos en antimicrobianos de tipo peptídico ya que la mayoría de sistemas inmunes de organismos superiores son la base de los mecanismos de defensa. La interacción péptido membrana ha sido descrita por varios parámetros fisicoquímicos, tensión superficial, potencial zeta, curvatura, fluorescencia, resonancia magnética nuclear (cambios de estructura por interacción) y todos ellos han aportado al planteamiento de diferentes modelos de interacción [3-5]. Entre ellos destacan el modelo de poro, modelo carpeta y gaps, la determinación del modelo por un péptido específico no es una tarea fácil y continúa siendo un campo de debate científico.

Varios modelos cinéticos cuantitativos ha sido plateados, todos ellos basados en el trabajo de Gregory et al [6,8], el cual plantea ecuaciones evolutivas en términos de flujos de liberación de una molécula fluorescente del interior de la vesícula por acción del péptido. Lo anterior significa que es necesario que el péptido pueda generar poros en la membrana para que el fluoróforo sea liberado y el modelo pueda ser aplicado. Las contribuciones principales de Gregory et al, se resumen en la demostración de la existencia de una relación límite de concentración péptido-membrana para obtener poros, la cual ha sido validada usando otras técnicas como calorimetría de titulación isotérmica y calorimetría diferencial de barrido [9]. Desafortunadamente, otros modelos de interacción como el modelo carpeta y gaps adolecen de un modelo cinético aun cuando han sido descritos y demostrados [10].

En el capítulo I, nosotros planteamos un modelo que no depende de la formación de poros y cuyas ecuaciones evolutivas están planteadas en términos de la concentración de péptido libre no adsorbido por la membrana. Para el comprobar el planteamiento de este modelo utilizamos la secuencia del C-terminal de una quimiosina que tiene las características generales del péptido antimicrobiano. Este modelo permitió establecer que el péptido se fija en la membrana atrayendo a los lípidos a una región confinada, aumentando la densidad lipídica local en la superficie, lo que se conoce como gaps superficiales. Esta fijación se realiza por la facilidad del péptido para tener un cambio estructural y optimizar las interacciones electrostáticas entre los lípidos y el péptido.

Entender el efecto del cambio estructural en nuestro modelo fue el siguiente paso a seguir, para esto nos dimos a la tarea de buscar un péptido de origen natural que tuviera las características generales de un péptido antimicrobiano catiónico pero que no pudiera cambiar de estructura por la interacción con la membrana (capítulo 2). Un estudio de bioinformática demostró que una clase de moléculas, llamados péptidos lasso, que no ha ganado gran relevancia pero que son especialmente prometedores como antibiótico clínico y que cumplían con los requerimientos antes mencionados. Estos péptidos son codificados en el ribosoma y por efecto de modificaciones post-traduccionales su estructura es rígida debido a que su C-terminal está atrapado por un anillo de macrolactama ubicado en el N-terminal. La obtención, purificación y caracterización estructural se describen en el capítulo I; para ello se utilizaron técnicas como expresión heteróloga, mutaciones puntuales, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), espectrometría de masas MS-MS² y dinámica molecular. Los datos obtenidos demuestran este péptido de carga positiva encontrado por minería genómica está altamente conservado y tiene una conformación de tipo lasso por un impedimento estérico ejercido por las Arginina-13 y Arginina-14.

La comparación entre el péptido lasso estructurado y el péptido con la misma secuencia pero sin estructura (sintético) frente a vesículas es mostrada en el capítulo III. Los resultados obtenidos muestran que la estructura es un parámetro que afecta la interacción péptido-membrana, y la especificidad de la molécula. El modelo cinético muestra que estos dos péptidos tienen propiedades cinéticas similares lo que significa que están guiadas por los mismos parámetros fisicoquímicos pero una vez adsorbidos en la membrana su comportamiento difiere, impulsado por la diferente interacción de los dos péptidos en fase lipídica.

Bibliografía.

- [1] Verdine, G.L. The combinatorial chemistry of nature. *Nature*. 1996, 384, 11,3.
- [2] Hancock, R.E.W; Patrzykat, A. Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: From natural to Novel Antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*. 2002, 2, 79-83.
- [3] Almeida, P; Pokorny A. Mechanisms of Antimicrobial, Cytolytic, and Cell-Penetrating Peptides: From Kinetics to Thermodynamics. *Biochemistry*. 2009, 48, 8083–8093.
- [4] Glukhov, E; Stark, M, Burrows, L; Deber, C. Basis for Selectivity of Cationic Antimicrobial Peptides for Bacterial Versus Mammalian Membranes. *J. Biol. Chem*. 280, 33960-33967
- [5] Ofelia Maniti, O; et al. Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012, 869-875.
- [6] Pokorny, A., Birkbeck, T. H., and Almeida, P. F. F. Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 2002, 41, 11044-11056.
- [7] Bechinger, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*. 1999, 1462, 157-183.
- [8] Gregory, S. M., Cavanaugh, A., Journigan, V., Pokorny, A., and Almeida, P. F. F. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys. J*. 2008, 94, 1667–80.
- [9] Henriksen, R; Andresen, T. Thermodynamic Profiling of Peptide Membrane Interactions by Isothermal Titration Calorimetry: A Search for Pores and Micelles. *Biophys J*. 2011, 100-109.
- [10] Huang, H. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1758, 1292-1302

Materiales y métodos generales

Esta sección se presenta los métodos experimentales generales realizados en este trabajo y están concatenados con las estrategias experimentales presentadas en cada capítulo. Sin embargo, existen algunos procedimientos específicos que no son presentados en esta sección, pero son ilustrados al lector en cada uno de los capítulos.

1. Minería genómica

Para la identificación de nuevos péptidos Lasso en Actinobacteria, se utilizó el enfoque ofrecido por la minería genómica sobre proteínas céntricas. Para obtener todos los B-homólogos de posibles complejos enzimáticos de péptidos Lasso, hemos utilizado dos vías: 1) Una búsqueda en Pfam sobre el phylum de Actinobacteria, usando como base a la familia core3 transglutaminasa, al que pertenece SroB2 (enzima que hace parte del complejo enzimático que codifica para SR15-2005); La segunda vía consistió en utilizar la proteína SroB2 como plantilla para un PSI-BLAST. Este protocolo uso los siguientes parámetros: algoritmo BLOSUM62, las secuencias reportadas con un máximo de 100 secuencias, un umbral 0.005 y 4 iteraciones [1].

Los resultados de Pfam y la última iteración de PSI-BAST fueron agrupados y todas las secuencias repetidas se descartaron. Los A-, C- y D-homólogos se buscaron ampliando en 5000 pares de bases tanto en la dirección 5'→3' como 3'→5' teniendo como base el gen-B homólogo encontrado. Utilizando el software ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; consultado el diciembre 2013) se determinaron los genes adyacentes. Los genes A, B y C homólogos fueron alineados utilizando MUSCLE y se agruparon manualmente en MEGA6 [2-3]. Para construir el árbol filogenético concatenado para los genes A, B, C, y D-homólogos se alinearon todas las secuencias en un solo archivo de alineación. Los modelos óptimos de sustitución fueron seleccionados utilizando la opción MODEL en MEGA6 con el tratamiento de delación parcial. El árbol filogenético fue construido usando el método de máxima verosimilitud con el mismo software. Las enzimas de maduración se analizaron adicionalmente utilizando Suite MEME para la búsqueda de motivos distintivos [4]. Se analizaron también los árboles filogenéticos de solo gen y la metodología fue similar a la utilizada para el árbol de clados.

2. Cepas, plásmidos, y medios de cultivo utilizados

S. roseosporus NRRL 11379 se utilizó para obtener el grupo biosintético *SroACB1B2D*. Células de *E. coli* químicamente competentes TOP10 se utilizaron para la clonación y *E.coli* BL21 (DE3) químicamente competentes para la expresión heteróloga. Las células competentes se adquirieron del fabricante Invitrogen. El plásmido pNIC28-BSA4 se utilizó como vector para la clonación. Los medios de cultivo son: **LB** (1,0% Bacto triptona, 0,5% de extracto de levadura Bacto, y 1,0% de NaCl); **M20** (20 g / L-glutámico, 0,2 g / L de L-alanina, 1,0 g / citrato de sodio L, 20 g / L de Na₂HPO₄, 0,5 g / L KCl, 0,5 g / L Na₂SO₄, 0,2 g / L MgCl₂ L, 0.0076 g / L

CaCl₂, 0,01 g / L FeSO₄, y 0,0076 g / L MnSO₄, pH 7,0) y M9 (17,1g / L Na₂HPO₄ · 2H₂O, 3 g / L de KH₂PO₄, 0,5 g / L de NaCl, 1 g / L NH₄Cl, 1 ml / l de solución MgSO₄ [2 M], 0,2 ml de solución de CaCl₂ [0,5 M], 20 ml / L de solución de glucosa [20% w / v] y 1 mg / ml de biotina y tiamina a pH 7,0); **M63** (13,6 g / L de KH₂PO₄, 2g / L de (NH₄)₂SO₄, 1 g / peptona L Bacto, 1 ml / l de solución MgSO₄ [2 M], pH = 7,0, 10 ml de solución de glucosa [20 % w / v], 1 mg / ml de biotina y tiamina a pH 7,0); **ISP2** (1 L contenía 4 g de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de dextrosa y 20 g de agar a pH 7), mientras que las cepas de *E. coli* se cultivaron en LB y M9 con 50 µg / ml de kanamicina.

3. Expresión endógena

Una concentración de esporas 10¹⁰ de *S. roseosporus* se inoculó de forma independiente en 1 L de M9, M20, M63, LB, y ISP2 y se incubó a 30 ° C durante 5 días. El crecimiento se siguió por aumento en la masa biológica y la presencia de esporas usando la técnica verde de malaquita. La masa biológica se estimó por la determinación de peso celular seco, para este fin, 100 ml de cultivo se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento se disolvió en 15 ml de acetona, la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se desechó. Para eliminar cualquier sal precipitada, el sedimento se suspendió en 10 ml de HCl 0,5 N, se centrifugó y se decantó. El sedimento se lavó con etanol y se secó a 30°C hasta que se alcanzó un peso constante, lo que confirma la pérdida completa de agua.

4. Estabilidad térmica y ensayo de proteasas

El péptido purificado SRO15-2005, y las variantes se investigaron mediante la incubación de 50 µL de los péptidos purificados a 92°C de 1 a 7 h y se analizaron adicionalmente por RP-HPLC, MS, y MS². La estabilidad frente a la degradación proteolítica de los péptidos Lasso y variantes fue analizada mediante la incubación de 25,0 µg del péptido purificado antes y después del tratamiento de calor con la carboxipeptidasa Y de Sigma Aldrich (usando las condiciones establecidas por el fabricante). Los ensayos se realizaron con 0,5 U carboxipeptidasa Y de 2 a 12 horas a 30 ° C.

5. Purificación de SRO15-2005 por expresión endógena

Un litro de *S. roseosporus* cultivado en LB, M9, M20, M63 o ISP2 se centrifugaron a 14.000 g y el sobrenadante se dividió en 4 alícuotas de 250 ml cada uno. Cada alícuota se aplicó a una columna que contiene 1,5 g de gel de sílice octadecil-funcionalizado de Sigma Aldrich. La columna se lavó con 5 volúmenes de 0,1% de TFA en agua y se eluyó con 20 ml de 0,1% de TFA en 100% de metanol; 80 ml del extracto final se secó con un evaporador rotatorio a 30 ° C, el sólido obtenido se reconstituyó en 1,5 ml de 50% de metanol. Posteriormente, 20 µl de la muestra se inyectaron a un sistema de RP-HPLC Shimadzu FCV-10vp analítica. Un gradiente tipo escalera se

obtuvo con dos disolventes, el disolvente A que se compone de 0,1% de TFA en agua y disolvente B con un 0,1% de TFA en acetonitrilo. La concentración del disolvente B se aumentó linealmente desde 0% a 30% en 15 min, seguido por un aumento del 30% al 35% en 10 min, y finalmente por 35% a 100% de aumento en 10 min. Para la cuantificación UV, el área de los picos fue integrada y se construyó una curva de calibración usando, todo esto usando como referencia un péptido sintético adquirido en PepMic Co, con la misma secuencia del péptido SRO15-2005 y variantes. Las columnas Hibar 250, c18, c18 4-6 y Júpiter 5u 300A columnas se utilizaron a 40°C para la purificación analítica y semi-preparativa, respectivamente.

6. Análisis de espectrometría de masas

Fracciones RP-HPLC fueron analizadas posteriormente por MS-MALDI-TOF y MS². Las alícuotas se aplicaron en la placa de la muestra y se mezclaron con un volumen igual de α -ciano-4-hidroxicinámico y se dejaron secar. Experimentos de MS/MS se realizaron en un QqTOF (QSTAR) espectrómetro de masas con una fuente de iones de nano electro pulverización. El $[M+H]^+$ ión fue seleccionado por la fragmentación (modo positivo 1 kV MS / MS) y 3000 disparos fueron aplicadas para el espectro MS². Los datos fueron analizados utilizando masa y softwares mMass [5].

7. Clonación del grupo biosintético *sroACBD*

Oligonucleótidos pertinentes fueron adquiridos de Sigma Aldrich, el grupo biosintético *sroACB1B2D* se amplificó por PCR usando Phusion polimerasa (con la adición de 5 M de betaína) de la siguiente forma: 5 min a 98 ° C, 30 ciclos de 30 s a 98 ° C, 30 s a 62 ° C, 30 s a 72 ° C, 1 min a 75 ° C, 2 min a 78 ° C, y una extensión final de 10 min a 78 ° C, con RoseoF1 y RoseoRv4 cebadores. El oligo iniciador es el RoseoFw1 tiene la siguiente secuencia: TGCCATATGATGCAGAAGTCAGTTGGGCATAA y contenía un sitio de restricción NdeI. La secuencia del cebador (reverse) RoseoRv4 es: GCGAAGCTTAGTCGACCTCCTCGGCGAAA y con un sitio de restricción HindIII. El resultado de PCR se confirmó en un gel de agarosa y se purificó con un kit de purificación de PCR de Thermoscientific GeneJet. El producto de PCR se digirió con NdeI y HindIII Fast digest de Thermoscientific usando las instrucciones del fabricante. El vector pNIC-BSA4 se digirió y se purificó en gel. Los fragmentos se ligaron con ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante la noche. El plásmido resultante, pNIC-SroACB1B2D, se transformó en la cepa de *E. coli* TOP10, seleccionada con kanamicina y secuenciado por MWG Eurofins. La región interior del SroACB1B2D también fue secuenciada con los oligos RBSseqNNfw (GATCAGCTGCGAACTCTCC) y RBSseqNNRv (TGGAAGAAGTCCTGGTAGAC), debido a que una parte de la secuencia reportada por el NCBI aparece como no reportada.

8. Ingeniería del grupo biosintético y mutaciones puntuales

De manera similar a la capistraina y al astexin, hemos encontrado una región palindrómica entre el *sroA* y *sroC*, que fue intercambiado por un sitio de unión ribosomal (RBS) optimizado para *E. coli* con el fin de aumentar la producción de la SRO15-2005 [6-8]. El plásmido se denominó pNIC-*sroArCB1B2D* y fue utilizado para la producción del péptido lazo. El plásmido pNIC-*sroArCB1B2D* se utilizó como plantilla para tres variantes (K8L, R13L, y R14L), lo que resultó en tres plásmidos diferentes. Se construyeron variantes dobles y triples. La amplificación del plásmido fue con Phusion como se muestra a continuación: desnaturalización de 5 min a 98 ° C, 18 ciclos de 30 s a 98 ° C, 30 s a 62 ° C, 2 min a 72 ° C, 3 min a 75 ° C, 4 min a 78 ° C y 10 min a 78 ° C. La PCR se purificó y se digirió con DpnI Fast digest de Thermoscientific, como se indica por el fabricante. Las digestiones se transforman directamente en las células TOP10 de *E. coli* y se seleccionaron con 50 mg ml⁻¹ de kanamicina, la secuenciación fue realizada por MWG Eurofin.

9. Inducción del grupo biosintético y purificación de SRO15-2005 y variantes

Células de *E. coli* BL21 (DE3) se transformaron con plásmidos o mutantes pNIC-*sroArCB1B2D* y se cultivaron en medio LB con kanamicina (50 mg ml⁻¹) o en medio mínimo M9 suplementado con tiamina (2 µg L⁻¹) y biotina (2 µg L⁻¹) y kanamicina (50 mg ml⁻¹) y se cultivaron a diferentes temperaturas (37 ° C, 30 ° C, 20 ° C, y 10 ° C). Las células se indujeron cuando los cultivos alcanzaron una DO: 0.6 con IPTG a una concentración final de 0,05 mM. Expresión fue seguida a diferentes tiempos de incubación. Las células se recogieron por centrifugación y se suspendieron en metanol (extracto A). El sobrenadante se mezcló con n-butanol durante 24 horas a 30 ° C y 200 rpm en un matraz de 3-L. N-butanol se retiró con un rota-evaporador. El producto bruto se suspendió en metanol hasta que fue solubilizado (Extracto B). Tanto el extracto A y B, se colocaron de forma independiente en una columna Sephadex LH20 metanol-equilibrada (resina de Sigma Aldrich). Las fracciones (3 ml) obtenidos se analizaron mediante MALDI-MS. Los rendimientos obtenidos fueron similares para todas las temperaturas y aumentaron con el tiempo de incubación. La condición de inducción seleccionada fue de 37 ° C y 4 días de incubación. Los rendimientos se determinaron comparándolos con una curva de calibración del péptido sintético.

10. Dicroísmo circular

Mediante el dicroísmo circular se evaluó la conformación en solución acuosa y otros medios previos a los ensayos microbiológicos. La estructura secundaria del péptido y su tendencia a generar alfa-hélices o beta plegadas dependen del medio en que se encuentre. Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en la región de (195-260 nm), con un barrido de 10 nm/min, un ancho de banda de 1 nm, 0.5 nm de resolución. 5 barridos se llevaron a cabo, se acumularon y se promediaron para cada muestra. Una concentración de 0.300 mg/mL del péptido se

diluyo en agua y en diferentes solventes (M9, agua/TFE). El aumento en la concentración de TFE de 0 a 60% v/v se hizo en incrementos de 10%. La elipticidad molar es medida en $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, calculada usando la fórmula: $[\theta] = [\theta_0]/10lcd$. Donde θ_0 es la elipticidad observada en milideg, l es el número de residuos, c es la concentración molar del péptido y por último d es el ancho de la celda [9]. La composición de elementos de estructura secundaria es analizada usando un software basado en re-des neuronales CDNN versión 2.1 [10] que utiliza un conjunto de 13 proteínas simples y un conjunto de 33 proteínas complejas.

11. Curvas de crecimiento

Crecimiento de *E. coli. Hms174 (DE3)*. Se inoculó la cepa en 100 mL de medio mínimo M9 (85 mM NaCl, 49 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 18 mM NH_4Cl , 0.80mM MgSO_4 y 0.4 % w/v glucosa). El cultivo se colocó en agitación a 200 rpm y 37° C por toda la noche. 20 μL de cultivo se inocularon en una serie de diluciones de péptido en M9 desde 0.0 mg/mL hasta 0.8 mg/mL en un polypropilene mincontier plate (Costar, Cambridge) con un volumen total de 200 μL . L (asegurando que la densidad óptica OD600nm sea igual a 0.05 a tiempo t_0) y se incubaron a 37°C. Los valores de OD600nm fueron medidos cada 15 minutos por 24 horas en el instrumento BioScreenC Tipo FMPOOC. El experimento fue repetido por triplicado. Una muestra de 10 μL fue esparcida sobre agar Mueller Hinton (MH) a los 30 minutos de iniciada la curva de crecimiento. Las bacterias sobrevivientes fueron contadas como unidades formadoras de colonia units/mL a las 12 h. Esté mismo procedimiento fue usado con otras cepas como *C. glabrata*, *S. cerevisiae*.

12. Liberación de calceína

Las vesículas grandes unilaminares (LUVs) están compuestas por PC, PE y colesterol (Ch) (SIGMA), en diferentes relaciones y dependiendo de la membrana a simular (mamífero o bacteria). El método de preparación de las LUVs fue por extrucción. Inicialmente se preparó una solución stock de los distintos fosfolípidos en cloroformo a una concentración de 10 mg/ml, tomamos 0.5 g de solución stock y la diluimos en más cloroformo, se evaporó en una corriente de nitrógeno por 2 horas eliminando todo el cloroformo, se hidrató en 3.5 ml de una solución que contenía 30 mM de calceína, 10 mM de buffer de fosfatos, 150 mM NaCl a pH 7.4. Después hay un periodo de incubación de 2 horas, en el cual hay ciclos de enfriamiento y calentamiento en continua agitación. Finalmente pasamos la muestra por un estructurador con un filtro de policarbonato de 0.22 μm por más de 10 veces. La calceína no atrapada fue separada por medio de una cromatografía de exclusión molecular sobre una columna Sephadex-G25. La presencia de LUV's fue determinada por microscopia de fluorescencia.

Los experimentos de concentración de calceína en el medio fueron llevados a cabo en un Biotek SynergyMx. La intensidad de fluorescencia se midió a 520 nm (excitación de 490nm). Una serie de concentraciones del péptido se colocaron en los pozos de un fluorímetro de microplacas con microtitulador (Costar, Cambridge). El máximo

de fluorescencia se determinó destruyendo las vesículas con 10% de detergente Tritón X100 como control positivo. El control negativo estaba dado por una solución de vesículas sin péptido. El porcentaje de calceína en medio se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% L = 100 * \frac{F - F_o}{F_{\max} - F_o}$$

Donde F_o es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{\max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y las diferencias fueron analizadas por la prueba *t-student*.

13. Isotermas de adsorción sobre vesículas

Las mezclas se incubaron por 40 minutos y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C, por 5 minutos. La determinación de la concentración de péptido en solución fue monitoreado por la disminución en la concentración del péptido en solución acuosa C_{eq} , con el instrumento NanoDrop 2000 Spectrophotometer and HPLC. La concentración adsorbida en la membrana Q es determinada ($C_o - C_{eq}$) siendo C_o la concentración inicial. Los datos obtenidos se validaron por prueba *t-student*.

Otro método usado es la utilización de HPLC de exclusión molecular, el péptido no adsorbido eluye lentamente que las vesículas con péptido adsorbido, el área bajo la curva obtenida está relacionada con la cantidad de péptido libre, para determinar la concentración de péptido libre se utilizaron curvas de calibración con péptidos de similar secuencia.

14. Dinámica molecular

La estructura de los péptido se obtuvieron de la base de datos PDB por difracción de rayos X a una resolución de 2.0 Å o por modelamiento en SYBIL-X. Se utilizó el paquete Visual Molecular Dynamics (VMD) para obtener el C-terminal de la proteína y mantener la conformación de alfa-hélice. Se utilizó GROMACS [11] para el péptido en una caja de 22 nm³ y se solvató con 4200 moléculas de agua, aunque estas medidas cambian dependiendo del sistema usado. El péptido se fijó en el centro de la caja y a las moléculas de agua se les permitió alcanzar un mínimo de energía por medio de un gradiente de minimización de la misma. El péptido entonces se liberó y se minimizó el sistema completo, el 1F9R más moléculas de agua, bajo el mismo esquema.

El sistema es calentado a 310K en periodo de 50 ps o a diferentes temperaturas según el sistema utilizado. Se incluyó el acoplamiento de presión y el sistema se equilibró por 2ns. Una vez que la última configuración fue alcanzada por el sistema es usada para iniciar la simulación membrana/péptido. Una membrana pre-equilibrada de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) se obtuvo del laboratorio de Tileman [12]. La membrana se equilibró por

6 ns a una temperatura de 310K para observar si no se presentaban cambios en la densidad de la membrana o desplazamiento lateral de los lípidos. Usando el programa VMD, la última configuración del péptido 1F9R se colocó sobre la membrana a una distancia de 1.2 nm de separación con la membrana y en el centro de ésta. Se utilizó GROMACS para ubicar a la membrana y al péptido en una caja de 6.02 x 6.02 x 9.5 nm y al solvatar el sistema con las moléculas de agua se alcanzó un total de átomos de 28632. Toda la simulación fue llevada con un intervalo de tiempo de 2 fs, a lo largo de las condiciones periódicas de frontera. Las interacciones de Lennard-Jones son parametrizadas a un radio de corte de 1.0/1.4 nm. Las interacciones electrostáticas fueron modeladas por el método de Ewald. Al sistema se le permitió alcanzar el equilibrio mediante minimización por gradiente descendente, hasta alcanzar una fuerza igual o menor a 850 kJ mol⁻¹ nm⁻², cuando el solvente es calentado. Finalmente la simulación, fue realizada por un periodo de 75 ns. El campo de fuerza de GROMOS 53 A6 fue utilizado para el sistema, que incluye los parámetros del modelo SPC para el agua. Los parámetros para los lípidos fueron los reportados por Berger. La temperatura permaneció constante utilizando el termostato de Nose-Hoover. Para la simulación se utilizó un esquema de presión (Parinello-Rahman) semi-isotrópica (uniformidad en los vectores x,y y z independiente). Las trayectorias fueron analizadas utilizando la paquetería desarrollado por GROMACS. Todos los cálculos fueron llevados a cabo en la supercomputadora KanBa-lam de la UNAM.

15. Dinámica molecular aplicada a péptidos Lasso

Dinámica molecular (MD) de SRO-15 de 2005 fue realizada con aguas explícita utilizando GROMACS 4.0.7 [13]. Se seleccionaron 5 conformaciones diferentes, llamadas CM1 a CM5, donde se utilizaron diferentes aminoácidos de estabilización. Las coordenadas iniciales de la C-terminal de CM1 a CM5 se adaptaron en SYBYL-X. Los péptidos se colocaron en una caja de 22-Nm³ y solvatados con 4000 moléculas de agua. El péptido se fija en el centro de la caja y las moléculas de agua se minimizan energéticamente. Finalmente, NTV simulación molecular se llevó a cabo durante un período de 40 ns a 300K, 325K, 350K y. Los archivos de trayectoria se llevaron a cabo utilizando herramientas analíticas proporcionadas por el paquete de software GROMACS y Descubrimiento Studio 2.1 (Accelrys Inc., San Diego, CA).

16. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Cultivos en fase exponencial de células de *E. coli* y *S. cerevisiae* y *C. glabrata* se incubaron con el CXCL4 / PF-457-70 péptido (600 mg / ml) a 37 ° C durante 24 h. Luego una centrifugación durante 30 min a 3000 g (4°C) fue realizada, el pellet resultante se lavó dos veces con agua estéril, y luego re suspendido en 3,0% de glutaraldehído durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se deshidrató en una serie de soluciones de etanol. Después del secado de punto crítico, capas con recubrimiento de oro 20 nm fue realizada. La microscopia fue realizada en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi, Tokyo, Japón) del departamento de biología.

17. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos usados en este trabajo son adquiridos desde diferentes compañías y sintetizados en fase sólida. El péptido CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ (1F9R) fue obtenido con una pureza mayor al 95% de Anspec Inc. El péptido con secuencia igual al péptido laso SRO15-2005 y sus variantes fue adquirida en PepMic Co con una pureza superior al 90%. Una purificación extra fue realizada para todos los péptidos usando RP-HPLC equipado con la columna Hibar Purospher Star RP-18e 5 mm (Merck) en un gradiente lineal de acetonitrilo-agua 0.1% TFA de 0% de Acetonitrilo hasta 100 % en un tiempo de 40 minutos y un previo equilibrio de 5 minutos con una concentración de 0% de acetonitrilo . Después de esto un análisis por MALDI-TOF (MS; Bruker) fue realizado para confirmar el péptido purificado obtenido.

18. Bibliografía.

- [1] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. a., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- [2] R. C. Edgar. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- [3] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- [4] Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. a., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., Noble, W. S. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, 202–208.
- [5] Niedermeyer, T. H. J., Strohal, M. (2012) *PLoS One*, 7, e44913.
- [6] Maksimov, M. O., Pelczar, I., Link, A. J. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15223-15228.
- [7] Pan, S. J., Rajniak, J., Maksimov, M. O., Link, A. (2012) *J. Chem. Commun.* 48, 1880.
- [8] Giannotta, F., Georis, J., Rigali, S., Virolle, M. J., Dusart, J. (2003) *Mol. Gen. Genomics.* 270, 337–346.
- [9]. Nguyen, L.T., Chan, D.I., Boszhard, L., Zaat, S.A., Vogel, H.J. (2010), *Biochim. Biophys. Acta.* , Vol. 1798(6), pp. 1062-1072.
- [10] Bohm, G., Muhr, R., and Jaenecke, R. 1992, *Prot. Eng.* Vol. 5, pp. 191-195.
- [11] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark E. A., Berendsen, J.C. H. (2005), *J. Comput. Chem.*, Vol. 26, pp. 1701-1718.
- [12] Aliste, Mp., Tieleman P, D. (2005), *BMC Biochem.*, Vol. 6, p. 30.
- [13] Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., Lindahl, E. (2008) *J. Chem. Theory Comput.* 4, 435–447.

DISEÑO DE UN NUEVO MODELO CUANTITATIVO DE INTERACCIÓN PÉPTIDO-VESÍCULA**1. Introducción**

La habilidad de los péptidos catiónicos de perturbar la membrana ha generado un gran interés biomédico por estas moléculas [1–3]. Los mecanismos de interacción péptido-membrana son cuestionados periódicamente y después de 20 años de intenso debate es aceptado que existen dos rutas de perturbación. La primera es llamada “*ruta independiente*” la cual no necesita de una maquinaria de internalización y está gobernada por las interacciones a nivel molecular entre el péptido y la membrana. La segunda es la “*ruta dependiente*” donde la difusión del péptido se realiza a través de endocitosis o bombas de difusión que son alimentadas por moléculas como el ATP.

La investigación en péptidos que utilizan la *ruta independiente* como mecanismo de acción biológica, se basan en el estudio de la interacción establecida entre péptidos y vesículas sintéticas. La vesícula es un modelo de estudio ideal ya que disminuye la complejidad del sistema péptido-célula; es fácilmente sintetizada y acepta cambios de composición lipídica. Esta última característica permite simular la composición de membranas celulares de diferentes organismos y establece una relación entre el modelo *in vitro* e *in vivo*.

Estudios en sistemas vesícula-péptido han establecido una serie de pasos que describen al mecanismo de interacción péptido-membrana, los cuales son señalados a continuación: 1. Adsorción del péptido en la superficie desde el seno de la solución; 2. Cambio estructural del péptido en la superficie e internalización en la fase lipídica; 3. Generación de estructuras supramoleculares constituidas por péptidos dentro de la membrana como poros o gaps.

La formación de estructuras supramoleculares en membranas de un organismo vivo alteran la fisiología, estructura y densidad de la membrana, lo que puede llevar a una rápida muerte celular. Varios modelos cinéticos han sido planteados en términos de estos pasos y sus ecuaciones evolutivas son coherentes con la adsorción y formación de poros. Plantear ecuaciones en términos fenomenológicos, obliga al modelo a establecer variables experimentales relacionadas con el fenómeno. La mayoría de los modelos planteados hasta el momento involucran el aumento de fluorescencia del medio, por liberación de un fluoróforo del interior de la vesícula, debido a la formación de poros en la fase lipídica. Los resultados obtenidos muestran que la formación de un poro depende de un valor de concentración crítica entre péptido-lípido en la superficie. Cuando se alcanza esta concentración, los poros predominan en la membrana y el fluoróforo es liberado del interior de la vesícula, aumentando la fluorescencia del medio, y permitiendo que el fenómeno de interacción sea monitoreado en el

tiempo. Si no es alcanzada esta relación de concentración los poros no son formados y una interacción simple péptido-membrana es obtenida.

El problema radica en que existen péptidos que tienen actividad contra la membrana y generan muerte celular pero no generan poros, lo que no permite que los modelos cinéticos antes mencionados sean utilizados. Entre los mecanismos de interacción que no generan poros destaca el modelo de gaps cuyas estructuras supramoleculares locales son formadas por las interacciones electrostáticas entre los residuos catiónicos del péptido adsorbido en la interfase y los aniones de la membrana (grupos fosfato). Como consecuencia de esta interacción el movimiento transversal de los lípidos es disminuido, y en algunos casos los grupos fosfato de lípidos que se encuentran dirigidos a la región intracelular también son atraídos. Como resultado de esto, el espesor de la membrana disminuye, complejos enzimáticos son desestabilizados y rutas metabólicas esenciales para la supervivencia del organismo no pueden establecerse.

La descripción cinética de este tipo de modelos de interacción no se ha planteado debido a la dificultad de establecer variables experimentales que se relacionen con este tipo de interacción biológica. La caracterización cinética es una ayuda invaluable para comprender el fenómeno, permite establecer el efecto de carga, estructura y otros parámetros relacionados con el mecanismo de acción. Además, establece y describe los pasos necesarios para que un péptido tenga actividad contra la membrana.

En este capítulo se diseñan nuevas ecuaciones diferenciales en función de parámetros diferentes a la elución de un fluoróforo y utilizando algunos conceptos de química superficial. Para comprobar la aplicabilidad del modelo cinético buscamos un péptido de origen natural, que por su estructura primaria no generara poros en la membrana y con características de péptido catiónico antimicrobiano. Para esto, buscamos proteínas relacionadas con el sistema inmune (quimosinas) ya que estas contienen un C-terminal que se fija en la membrana celular (similar a un ancla) y un N-terminal que interactúa con el receptor. Un análisis de varios C-terminales de quimosinas permitió establecer un péptido con características similares a péptidos catiónicos y con un tamaño de 16 aminoácidos, este último parámetro es importante porque un péptido con un número de residuos inferior a 19 no favorece la formación de poros.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que la interacción del péptido no está sólo gobernada por fuerzas electrostáticas sino existen otros fenómenos involucrados. El modelo cinético planteado se ajusta a los datos experimentales obtenidos y los valores de las constantes cinéticas establecidas apoyan la existencia de otros fenómenos superficiales. Los resultados cinéticos establecen que las vesículas se comportan como superficies que están en equilibrio dinámico con los péptidos en solución acuosa.

Los análisis por dinámica molecular muestran que el péptido necesita de un cambio conformacional para optimizar la interacción y generar gaps en la membrana. Los cambios conformacionales de los péptidos catiónicos

han sido la respuesta por excelencia para la discrepancia entre los datos registrados y los modelos teóricos, incluyendo el desarrollado en este trabajo. Además se ha argumentado que el cambio conformacional por interacción con la membrana es fundamental en la ruta de interacción. El modelo de cinético por ende está condicionado a este cambio conformacional que en algunos casos es considerado el paso limitante del proceso. Sin embargo ningún modelo incluye variables de cambio conformacional en sus modelos, debido a la gran cantidad de interacciones a la que está sometido un péptido en la interfase y la complejidad del fenómeno.

Una solución alternativa para determinar el efecto que tiene el cambio estructural en el modelo cinético y de interacción con la membrana es evaluar un péptido con conformación restringida y uno péptido homólogo pero sin restricción. La idea anterior abre las puertas del capítulo II y III de este proyecto, en los cuales tienen como objetivo purificar, caracterizar y evaluar un péptido de origen natural catiónico con conformación restringida y contrastar su comportamiento con un péptido homólogo pero sin estructura.

1.1 Descripción de modelos de interacción entre péptidos y membranas celular

El primer paso en el proceso de internalización de un péptido catiónico en la membrana es la adsorción del péptido en la superficie. Este fenómeno superficial está gobernado por la interacción electrostática e hidrofóbica del péptido con los fosfolípidos aniónicos presentes. Esta interacción puede afectar la conformación espacial de los péptidos y la membrana. En los péptidos se puede inducir un plegamiento de tipo alfa o beta y en la membrana puede haber un reordenamiento lipídico. Posterior a la interacción péptido - lípido en la interfase agua-membrana, el péptido puede insertarse en la fase lipídica y generar estructuras supramoleculares como poros o simplemente atravesar la membrana (**Figura 1.1**). A continuación se desglosan cada uno de los pasos antes mencionados.

Adsorción de los péptidos en la membrana

El tipo de adsorción del péptido en la membrana dirige los pasos subsecuentes de interacción y por ende el mecanismo de acción del péptido catiónico [3]. Como fue mencionado anteriormente, este fenómeno está dirigido por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre el péptido y los lípidos constituyentes de la membrana. Por ende, no es de extrañar que una clasificación en torno a la capacidad de interacción (anfipaticidad) del péptido con la membrana haya sido planteada para diferenciar las diferentes clases de péptidos catiónicos. En esta clasificación los péptidos son divididos en tres categorías:

1. Péptidos anfipáticos primarios, los cuales tienen dominios catiónicos e hidrofóbicos bien definidos [4, 5].
2. Péptidos anfipáticos secundarios que no tienen dominios bien definidos [6, 7], pero alcanzan una conformación de alfa-hélice o beta-plegada por la interacción con la membrana, lo que les permite establecer dominios hidrofóbicos definidos.

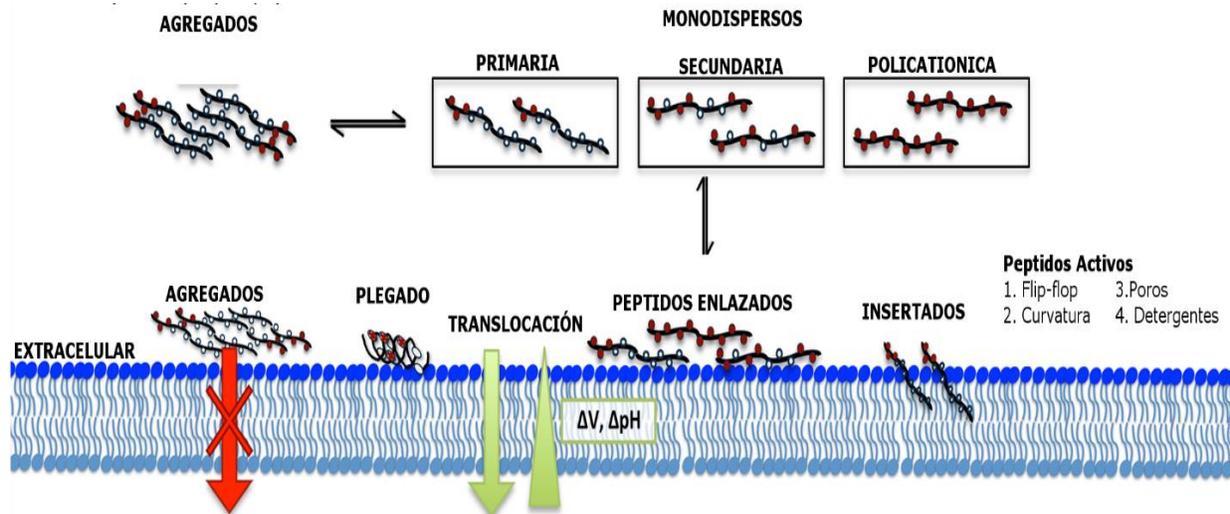


Figura 1.1 Mecanismos de interacción de péptidos. Se pueden dividir en diferentes fenómenos, todos ellos promueven una inserción del péptido en la membrana.

3. Péptidos anfipáticos poli catiónicos donde solo existen aminoácidos de carga positiva o no polar [8, 9].

En esta clasificación, los péptidos como Pep1 y TP10 son considerados como péptidos anfipáticos primarios. Péptidos como Penetratin y el R6/W3 son clasificados como secundarios y por último los péptidos Tat y Arg9 como péptidos policationicos (**Tabla 1.1**). El objetivo principal de esta clasificación es encontrar similitudes de interacción entre péptidos clasificados en un mismo grupo y poder establecer reglas generales para predecir los mecanismos de acción de futuros péptidos catiónicos. Por esto, a continuación se muestran las características generales de interacción de cada grupo con vesículas sintéticas.

Tabla 1.1 Péptidos ampliamente estudiados donde se destaca su carga y conformación al interactuar con membranas lipídicas.

| Nombre | Secuencia | NR | Carga | PM | Clase | EPIPL |
|------------|----------------------|----|-------|------|------------|------------------------------|
| Penetratin | RQIKIWFQNRRMKWKK | 16 | +7 | 2247 | Secundario | α -hélice y hoja Beta |
| Tat | GRKKRRQRRRPPQ | 13 | +8 | 1719 | Catiónico | Hebra al azar |
| Arg9 | RRRRRRRRR | 9 | +9 | 1423 | Catiónico | Hebra al azar |
| R6/W3 | RRWRRWRR | 9 | +6 | 1514 | Secundario | α -hélice |
| Pep-1 | KETWWETWWTEWSQPKKRKY | 21 | +5 | 2846 | Primario | α -hélice |

NR: Número de Residuos; **PM:** Peso molecular; **EPIPL:** Estructura obtenida al interactuar con fosfolípidos

Afinidad de péptidos anfipáticos primarios por vesículas

Los péptidos anfipáticos primarios interactúan fuertemente con membranas aún en ausencia de fosfolípidos aniónicos (con un coeficiente de partición cercano a 10^4 M). Su afinidad por las membranas ha sido determinada por titulación de una solución peptídica acuosa con vesículas unilaminares (LUV's) siguiendo la fluorescencia del triptófano o a un fluoróforo contenido en las LUVs. Experimentos en superficies de plasmones

demuestran que la interacción de péptidos anfipáticos está guiada principalmente por interacciones hidrofóbicas, sin importar que se incremente ligeramente la concentración de aniones en la superficie [10–13].

Representantes de este grupo son el Pep-1 y el TP10 los cuales cumplen con las características generales del grupo y por ende su forma de interacción debería ser similar. Sin embargo, sus mecanismos de acción difieren completamente, mientras TP10 induce la formación de poros Pep-1 no lo hace. El péptido Pep-1 parece demostrar que su afinidad no únicamente está gobernada por interacciones hidrofóbicas; sino por características superficiales de la LUV's. Recientes investigaciones muestran una alta afinidad por membranas curvas [14]; lo que indica que la adsorción del péptido en la superficie es desigual y está guiada por “defectos” de ésta [13]. TP10 exhibe alta afinidad por LUV's al igual que Pep-1; sin embargo, su afinidad por las fases líquidas desordenadas (L_d) en vesículas unilaminares gigantes (GUVs), es mucho mayor que Pep-1 [15]. La diferencia de afinidades por fases L_o y L_d , no ha sido explicada, pero es aceptado que la estructura alcanzada por los péptidos por la interacción con los lípidos podría ser la que dirige esta afinidad y por ende el mecanismo de acción (**Figura 1.2**).

Afinidad de péptidos anfipáticos secundarios por vesículas

Los péptidos anfipáticos secundarios interactúan tan eficientemente como los péptidos anfipáticos primarios. La afinidad del Penetratin ha sido documentada por un largo periodo de tiempo cercano a los 15 años. Isotermas de unión se han realizado usando Penetratin marcado con un fluoróforo llamado 7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3 diazole fluoróforo [16] o con el seguimiento del triptófano [17–21]. La constante aparente de partición tiene un valor aproximado de $10^6 M^{-1}$ para LUV que contienen >20% fosfolípidos aniónicos y cae drásticamente cuando se disminuye esta concentración; una afinidad similar es determinada para el R6/W3 [22]. Lo anterior indica que la interacción depende de la carga de la membrana y está dirigida por las cabezas polares de los fosfolípidos. Un resultado importante para el Penetratin y que diverge del R6/W6 es que cuando el Penetratin interactúa con la vesícula, la concentración en solución disminuye rápidamente llegando a obtener concentración de péptido en la solución acuosa en el rango micro molar [23]. Esto confirma que el péptido se acumula sobre la membrana y nuevas interacciones no específicas empiezan a gobernar la interacción en la superficie de la membrana [23].

La afinidad del Penetratin ha sido cuantificada usando calorimetría de titulación isotérmica (ITC), obteniendo valores similares a los ya reportados [23]. Estos estudios demuestran que la afinidad está dirigida principalmente por la entalpía y como consecuencia de esto, la interacción no es favorecida por los efectos hidrofóbicos clásicos como desolvatación (Entropía) y si por efectos hidrofóbicos no clásicos como empaquetamiento de lípidos, hidratación de cabezas polares lipídicas y cambios conformacionales. El reordenamiento de la membrana inducido por estos péptidos han sido observado experimentalmente [24] y este explica parte de la energía en forma de calor liberada durante el ITC entre el Penetratin y la vesícula [23,25]. (**Figura 1.3**).

Afinidad de péptidos anfipáticos policatiónicos por vesículas

Los péptidos anfipáticos poli cationicos no contienen residuos fluorogénicos, por esto es necesario usar técnicas de derivatización química [26, 27]. La fluorescencia de Tat sobre GUV's se incrementa con el contenido de lípidos aniónicos y decrece en la presencia de sales, mostrando que es fundamental las interacciones electrostáticas entre el Tat y la membrana. Determinación de coeficientes de difusión para este péptido muestran que el Tat difunde rápidamente sobre las membranas de fosfolípidos [26]. Los resultados obtenidos en ITC son compatibles con los estudios de fluorescencia y estiman que la contribución electrostática es cerca del 80% de energía de enlace entre el péptido y la membrana [28]. Además muestran que la interacción con la membrana está dirigida por la entalpía y que la entropía del enlace incrementa con la temperatura, como consecuencia del aumento de interacciones hidrofóbicas por desolvatación del péptido [28]. La afinidad de Arg9 por membranas es alta y sorprende que sólo el 33% de la energía de interacción sea por contribuciones electrostáticas ya que está constituido por aminoácidos cationicos. Sin embargo, es importante resaltar que en un mismo análisis con lisinas no se obtiene el mismo resultado, lo que indica que los puentes de hidrógeno juegan un papel importante en esta interacción, lo que explica la diferencia entre los dos péptidos.

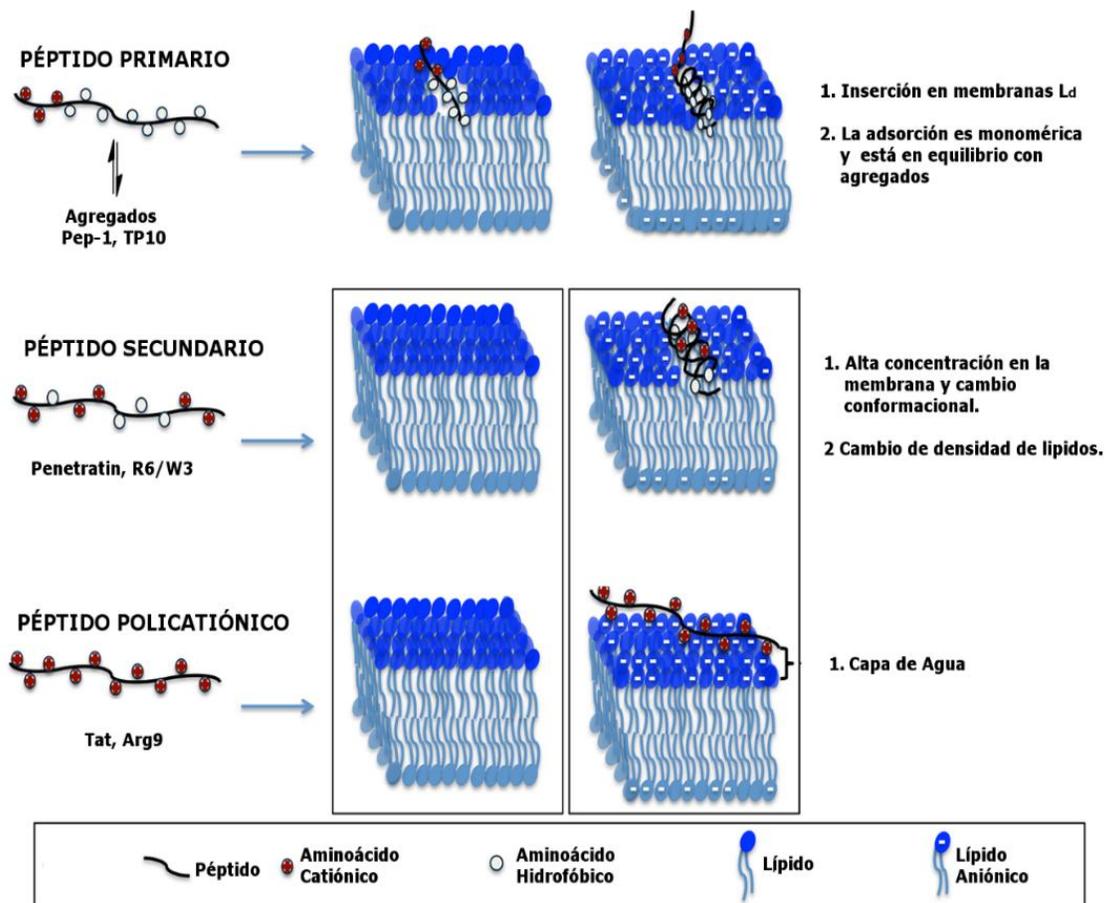


Figura 1.2. Mecanismos de Accion. Afinidad, estructura e inserción de péptidos anfipáticos primarios, secundarios y poli cationicos.

Cambios conformacionales de los péptidos cuando interaccionan con la membrana

Cambios estructurales de los péptidos cuando están adsorbidos en la membrana se han relacionado con sus propiedades de inserción [29,30]. En la siguiente sección se describen las transiciones estructurales de los péptidos catiónicos no estructuradas por interacción con vesículas, hasta el momento reportadas.

Péptidos que adquieren conformación alfa-hélice por interacción con la membrana tiene las siguientes características: son hebra al azar en solución acuosa pero en la presencia de fosfolípidos pueden alcanzar un parcial o completo plegamiento tipo alfa-hélice, ejemplo de ello es Pep-1, TP10 y R6/W3 [31-33]. Péptidos que adquieren conformación tipo hojas beta, ejemplo el Penetratin. Sin embargo este último tiene un comportamiento ambivalente donde el plegamiento depende de las condiciones experimentales usadas, obteniendo diferentes transiciones estructurales [34, 35]. Por último péptidos que son hebras al azar en la fase acuosa y se mantienen aun cuando esta interaccionando con la vesícula son escasos y se afirma que su estructura depende de las condiciones de la membrana, ejemplo de ellos es el Tat y Arg9 [33].

Estructuras supramoleculares y agregación

La agregación de péptidos en solución puede influenciar la interacción con la membrana. Esta propiedad es innata es péptidos anfipáticos y experimentos para determinar la concentración micelar crítica de éstos (Pep-1, TP10) demuestran la formación de agregados en solución acuosa. Péptidos poli-catiónicos como Tat y Arg9 no tienen interfases anfipáticas, por ende, no hay agregados en solución.

Modificación de la membrana inducida por péptidos

Varias modificaciones de la membrana son inducidas por CPP entre ellas se encuentran, modificación de la densidad puntual lipídica o reorganización lipídica, permeabilización de la membrana por formación de poros y alteración de la simetría membrana.

Reorganización lipídica

Un modelo que describe las variaciones de densidad puntual en la membrana por interacción con péptidos es llamado modelo carpeta. En este modelo los péptidos son acumulados en la superficie hasta alcanzar una densidad local superficial que le permite fragmentar la membrana [36] (**Figura 1.3**). Otras modificaciones inducidas en la membrana por la presencia de péptidos anfipáticos son más sutiles y se reducen a aumentar la densidad puntual por secuestro de lípidos que disminuye la movilidad de los fosfolípidos [37].

Formación de poros y alteración de la dinámica flip-flop de los lípidos

Los poros generan defectos en la capa lipídica permanentes que permiten que hayan flujos difusivos del interior de la célula al exterior de la célula. Algunos residuos han sido relacionados directamente con la formación de poros; entre ellos se encuentra las arginina y las lisinas, a las que se les atribuye interaccionar con la membrana y facilitar la inserción en la capa lipídica. Ya cuando el péptido se encuentra en la fase intermembranal, este puede

actuar como semilla para la formación de poros por agregación. Algunos péptidos, como el Tac, al parecer utilizan el poro generado por ellos mismos, como ruta alternativa para atravesar la membrana y atacar varios sistemas constitutivos de la célula [39]. Otra alternativa de perturbación de la membrana es alcanzada cuando péptidos inducen cambios posicionales de las cabezas polares de los lípidos (flip-flop). El Magainin 2 puede revertir la posición de los lípidos y algunas investigaciones han asociado este fenómeno a la formación de poros, en forma similar a los toroides (**Figure 1.4**) [40]. Otro ejemplo es el Tat que actúa cooperativamente, lo que significa que al exceder cierto límite de concentración de péptido adsorbido en la membrana exterior, este es capaz de atraer a los fosfatos del interior de la membrana hacia la exterior disminuyendo el espesor de esta [38].

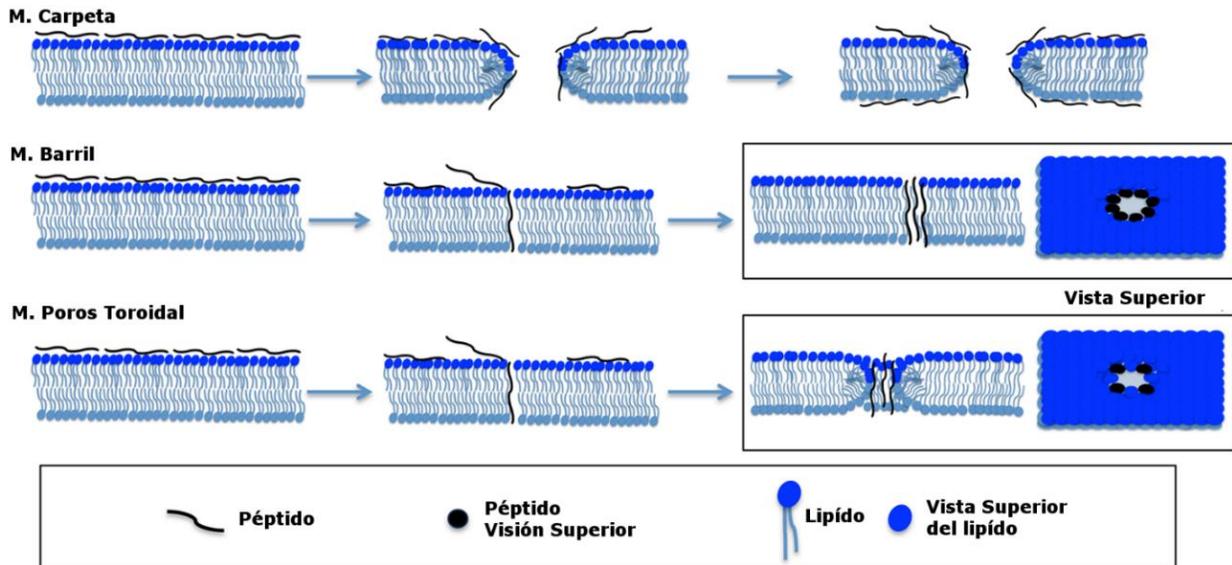


Figura 1.3 Mecanismos de cómo los péptidos pueden perturbar la membrana.

1.2. Características generales de péptidos perturbadores de membrana.

Los péptidos antimicrobianos tienen como características generales como ser de bajo peso molecular y tener dominios muy hidrofílicos e hidrofóbicos que permiten desestabilizar la membrana celular y, por ende, provocar la muerte celular. Decenas de péptidos antimicrobianos han sido reportados, y aunque no se ha podido determinar una secuencia consenso, la presencia de aminoácidos como lisina o arginina aseguran una fuerte interacción con la membrana. La alta divergencia en secuencia acompañada por la variedad de mecanismos de interacción hace que la idea de asociar una característica específica en términos de estructura primaria es obsoleta. A su vez, la relación entre estructura y actividad microbiana es muy difícil de establecer, debido a que cada péptido antimicrobiano puede tener diferente actividad ante diferentes microorganismos [41]. Sin embargo, algunas propiedades fisicoquímicas parecen mantener un difuso patrón entre los péptidos catiónicos, por lo que a continuación mostraremos algunas de estas propiedades y su contribución al entendimiento de la actividad (**Figura 1.4**).

Conformación

Las conformaciones alfa-hélices en los péptidos son abundantes en fluidos extracelulares de insectos y ranas [42]. Estos presentan una conformación no estructurada en solución, y alcanzan su estructura activa por interacción con la membrana. Muchos polipéptidos en vertebrados son toxinas, como el ántrax, que están en forma de hoja-beta y tienden a formar barriles en el interior de la membrana, que conectan al interior con el exterior, lo que lleva a la lisis y, por consiguiente, la muerte celular [43]. Conformaciones diferentes a éstas han sido poco reportadas; un ejemplo de ello es la hélice tipo II para péptidos enriquecidos con residuos de prolina y arginina [44].

Carga (ϖ)

La mayoría de péptidos tienen una carga neta positiva que se encuentra entre +2 y +9. Para aquellos péptidos que se encuentran cercanos a +9 los dominios catiónicos están bien definidos, y se sabe que son importantes para establecer una atracción efectiva con la carga negativa de los fosfolípidos de membranas de bacterias y otros microorganismos (**Figura 1.4**). El efecto en el aumento de la carga positiva en la actividad fue estudiado en la Magainina 2 donde se mantuvo constante la hidrofobicidad y estructura secundaria (alfa-hélice) pero la carga positiva aumentó de +3 a +5, como consecuencia de esto, la actividad antimicrobiana contra bacterias aumentó [45]. Sin embargo, con cargas superiores a 6+ se incrementó la actividad hemolítica y la actividad antimicrobiana disminuyó contrario a lo predicho [46]. Como explicación a la disminución de actividad antimicrobiana se planteó que al tener un dominio electrostático tan grande (superior a 6+) el péptido quedo retenido en la interfase membrana-agua, lo que no le permitió establecer su mecanismo de actividad antimicrobiana [46].

Hidrofobicidad (H)

Es normalmente aceptado que los péptidos catiónicos tengan una cantidad significativa de residuos hidrofóbicos y cercana al 50 % de la secuencia total. La hidrofobicidad es una característica fundamental en estos péptidos, necesaria para la permeabilización e inserción en la membrana. Sin embargo, los incrementos y el carácter hidrofóbico aumentan su toxicidad en células de mamífero y una disminución en la actividad antimicrobiana [46]. La hidrofobicidad y el carácter hidrofílico del péptido le dan el carácter anfipático al péptido. Esta propiedad puede ser optimizada al interactuar con la membrana y obtener una conformación que permita exponer estos dominios. Una medida del carácter anfipático del péptido es el momento hidrofóbico μ que es calculado como la suma vectorial de las hidrofobicidad de cada uno de los aminoácidos que componen el péptido, normalizado a una hélice alfa ideal [47]. El incremento en el momento hidrofóbico resulta en un aumento en la permeabilización de la membrana de mamífero pero en solución acuosa promueve la agregación de éstos. La aglomeración es un proceso que afecta el mecanismo de interacción, reduciendo su actividad y aumentando la

concentración de péptido necesaria para perturbar la membrana. No obstante, en el núcleo membranal, la asociación de estos péptidos facilita la formación de canales [43].

Helicidad (Ψ)

Muchos estudios demuestran que la helicidad es un parámetro que influye directamente con la toxicidad de los péptidos (**Figura 1.4**). Se ha reportado que ciertos aminoácidos favorecen la adopción y estabilización de la estructura alfa-hélice del péptido por interacción con la membrana. Por ejemplo, en el estudio del péptido Melittin donde se intercambiaron glicinas por leucinas (aminoácidos que favorecen la formación de alfa-hélices) aumentó la actividad hemolítica y antimicrobiana. Incorporaciones de prolina en el N-terminal (disruptor de alfa-hélice) de la Cecropina, reducen la actividad antimicrobiana contra bacterias. Aunque estos experimentos muestran la importancia de la helicidad, es poco probable encontrar una correlación cuantitativa entre actividad y helicidad. Un ejemplo de esto es un estudio donde se llevaron a cabo sustituciones seriales por L-aminoácidos a un péptido molde, lo que mantuvo constante la carga y redujo la estructura helicoidal. Los resultados muestran que hay una retención en la actividad antimicrobiana y pérdida de citotoxicidad en células de mamífero, lo cual no permite establecer relaciones cuantitativas [48].

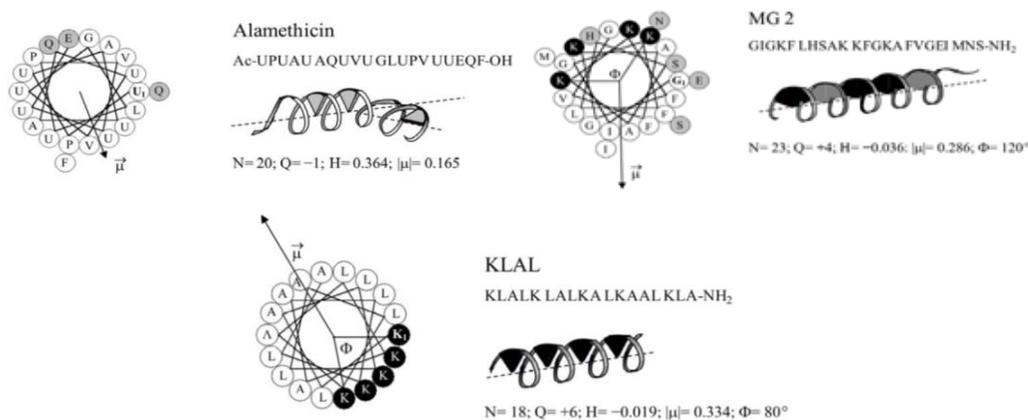


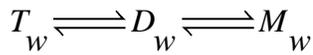
Figura 1.4. Características fisicoquímicas determinadas para los péptidos antimicrobianos. Alameticina, Magainina2 (MG) y KLAL. Los grupos cargados positivamente se muestran en color negro y los hidrofílicos de color gris. También se reportan las propiedades como tamaño (N), Hidrofobicidad (H), momento hidrofóbico (μ) y Ángulo polar (ϕ) (9).

1.3 Modelos Cinéticos de Cuantitativos de interacción péptido-membrana

Modelo Cinético de interacción para la δ -lysina sobre vesículas sintéticas

La δ -lisina es una toxina hemolítica de 26 aminoácidos secretada por *Staphylococcus aureus*, con estructura aleatoria en fase acuosa y con cambio estructural a alfa-hélice tras la unión a bicapas. La formación de poros ha sido asignada como su principal mecanismo para la disrupción de la membrana. El modelo cinético fue planteado

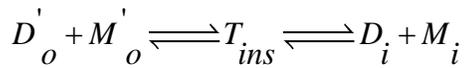
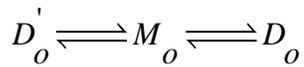
de la siguiente forma: Para la disociación del péptido en fase acuosa se plantea un equilibrio entre monómeros (M_w), dímeros (D_w), y trímero (T_w) en fase acuoso [50].



La asociación con la membrana está dada por



Donde L es la concentración de lípido, M_o y D_o' son concentraciones de monómero y dímero adsorbidas en la capa exterior de la vesícula. Para los fenómenos de asociación y desorción del péptido en la membrana se plantean las siguientes ecuaciones:



El primer proceso se lleva a cabo en el exterior de la vesícula, donde D_o es la especie más estable. El segundo proceso es la internalización de un trímero T_{ins} y por último es la formación de dímeros en la capa interna de la membrana [50]. La ecuación evolutiva del modelo es:

$$\frac{dCF_{out}}{dt} = k_{eflx}(1 - CF_{out})T_{ins} / (v_o L)$$

Esta ecuación utiliza a CF_{out} concentración de fluoróforo liberado desde las vesículas por el efecto de un poro conformado por péptidos insertados en la membrana T_{ins} y la concentración de lípido $v_o L$ permanece como una magnitud constante [50].

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la velocidad de liberación del fluoróforo depende de la concentración y composición lipídica en la vesícula. Esta observación implica que un número crítico de péptidos en la vesícula son necesarios para la liberación de carboxifluoresceína atrapada. Para proponer un mecanismo detallado, ellos evaluaron la localización del péptido en la vesícula en función del tiempo. Los resultados indican que cuando la concentración de péptido sobre las vesículas es alta, el péptido atraviesa la membrana al interior de la vesícula a una tasa similar a la de un proceso de difusión simple [50]. En el caso contrario, a baja concentración de péptido sobre la vesícula la inserción de péptidos se produce muy lentamente. Otras observaciones, como una pequeña liberación de carboxifluoresceína a altas concentraciones de lípidos,

refuerzan la hipótesis de que la agregación del péptido en la superficie de la vesícula es un paso esencial para la penetración de la membrana.

Análisis de péptidos más cortos que el grosor del bicapa hidrofóbica, tales como mastoparan (14 aminoácidos), o incluso más corto como péptidos sintéticos, con base en este modelo cinético, han concluido que estos péptidos son capaces de permeabilizar las membranas [51]. No obstante, la adquisición de una orientación tipo alfa-hélice por parte del péptido es poco probable, por lo que se sugiere la formación de otro tipo de estructuras que simplemente rompen con la simetría de la membrana (**Figura 1.5**).

Los valores de las constantes cinéticas obtenidas para adsorción y desorción del péptido están en el mismo orden de las constantes de difusión que tendría un péptido catiónico en solución acuosa o en una fase lipídica cuando es atraído por una carga opuesta. Lo anterior significa que la interacción con la membrana es debida a la interacción electrostática entre los grupos fosfato y los residuos catiónicos. Este modelo por lo tanto refuerza la idea de que las estructuras supramoleculares son el paso lento en el modelo cinético, ya que la adsorción y desorción son simples pasos guiados por fuerzas electrostáticas. Establecer la estructura supramolecular como paso limitante, determina la velocidad del proceso, y aísla otros procesos que pertenecen a la fenomenología ya establecida para la interacción vesícula-péptido catiónico.

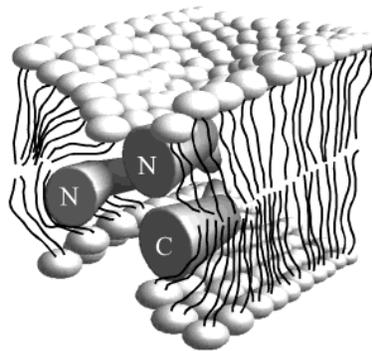


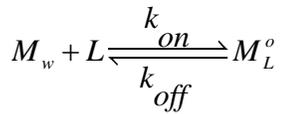
Figure 1.5 Representación gráfica de la distorsión de la membrana. Péptidos de bajo peso molecular establecidas a partir del modelo cinético planteado para la δ -Lysin [50].

Modelo cinético para el Transportan 10

El mecanismo de la interacción entre el TP10 y las membranas de fosfolípidos fue valorado con la metodología experimental anterior y ecuaciones evolutivas (ecuación diferencial dependiente del tiempo) nuevas. Este péptido induce la liberación gradual del fluoróforo atrapado en las vesículas y posee una alta cantidad de aminoácidos catiónicos, mucho mayor a la de los péptidos catiónicos convencionales. Estudios anteriores a este muestran que este péptido difiere de péptidos que son considerados generadores de poros y es considerado un perturbador de membrana. El mecanismo de inserción en la membrana del transportan 10 es considerado similar a la difusión pasiva, aunque presenta cambios estructurales del C-terminal hacia alfa-hélice y un N-terminal que no cambia su

estructura. La perturbación que genera en la vesícula permite que el fluoróforo en el interior de este sea liberado. El modelo cinético supone que, de forma similar a la δ -lisina, el TP10 se asocia con la vesícula y al hacerlo crea una masa de desequilibrio que perturba a la membrana [10].

El modelo cinético planteado es:



Donde L es la concentración de lípido en solución acuosa, M_w y M_L es el monómero enlazado en la vesícula, las ecuaciones diferenciales son:

$$\frac{dM_w}{dt} = -k_{on} M_w [L] + k_{off} M_L^o$$

$$\frac{dM_L^o}{dt} = k_{on} M_w [L] - k_{off} M_L^o$$

Este sistema de ecuaciones tiene solución analítica, las cuales son presentadas a continuación:

$$M_w(t) = \exp(-k_{app} t)$$

$$k_{app} = k_{on} [L] + k_{off}$$

Al igual que en el anterior modelo los valores de k_{on} son similares a los obtenidos en el modelo de la δ -lisina donde el orden de magnitud es similar al valor obtenido por difusión de una carga en un medio acuoso. Sin embargo su contribución radica en que señala a los lípidos como un factor decisivo en el mecanismo de acción adoptado por el péptido y por ende deben ser incluidos en las ecuaciones evolutivas del modelo. Pero como se observa en su planteamiento matemático los lípidos ya se encuentran incluidos en su modelo, pero como variable macroscópica (Concentración), y su interpretación implica describir a los lípidos desde un punto microscópico.

Modelo cinético de la Cecropina A

El comportamiento de la Cecropina A frente a vesículas sintéticas tiene un comportamiento particular en donde la liberación del fluoróforo es completa. Un estudio de liberación del fluoróforo mostró que cecropina A se une irreversiblemente a las vesículas, y que, en un cierto punto la coexistencia péptido-vesícula entra en un estado inestable y la formación de poros tiene lugar. Esto indica que el poro es formado cuando se alcanza un estado metaestable en la superficie de la membrana, después de esto la membrana se estabiliza por desintegración del poro. El modelo cinético consta de cuatro posibles escenarios para el péptido antimicrobiano; el primero la cecropina Pw se encuentra no estructurada y en solución, luego de ser adsorbida la cecropina alcanza un estado

plegado P_L y la vesícula permanece estable con el fluoróforo en el interior; la formación de poros es el tercer escenario y es descrita por la variable P^* , por último está el escenario donde la cecropina permanece enlazada pero la vesícula ya está libre de fluoróforo (P_{emp}). La **Figura 1.6** presenta una descripción gráfica del modelo.

El primer paso de este mecanismo explica la interacción péptido-vesícula donde las constantes de disociación k_{on} y k_{off} son constantes que describen el enlace o disociación del péptido ya sea en vesículas llenas o vacías. Las constantes de k_{on} y k_{off} están asociadas a la formación de poros en las vesículas, que a su vez son consideradas inestables. Las ecuaciones del modelo son:

$$P_w \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}[L]} P_L \text{ Las ecuaciones evolutivas son:}$$

$$\frac{dP_w}{dt} = -k_{on}P_w[L] + k_{off}P_L$$

$$\frac{dP_L}{dt} = k_{on}P_w[L] - k_{off}P_L$$

La solución analítica es:

$$\frac{P_w(t)}{P_w(0)} = Ce^{-k_{app}t} + (1-C)$$

$$\frac{P_w(t)}{P_w(0)} = C(1 - e^{-k_{app}t})$$

Donde C es una constante de diferenciación, la k_{app} es una constante aparente resultado del proceso de diferenciación que esta expresada en términos de k_{on} y k_{off} :

$$k_{app} = k_{on}[L] + k_{off}$$

Esta ecuación es muy importante porque permite establecer una relación entre k_{on} y k_{off} con la concentración lipídica y que se ajusta a una recta. Esto significa que si se establecen diferentes k_{app} para diferentes concentraciones lipídicas, es posible obtener k_{on} y k_{off} .

Los resultados muestran que los valores de k_{on} y k_{off} están en el orden de magnitud de la difusión de una carga en medio acuoso, además establecieron que existe una relación crítica péptido-lípido para a formación de un poro.

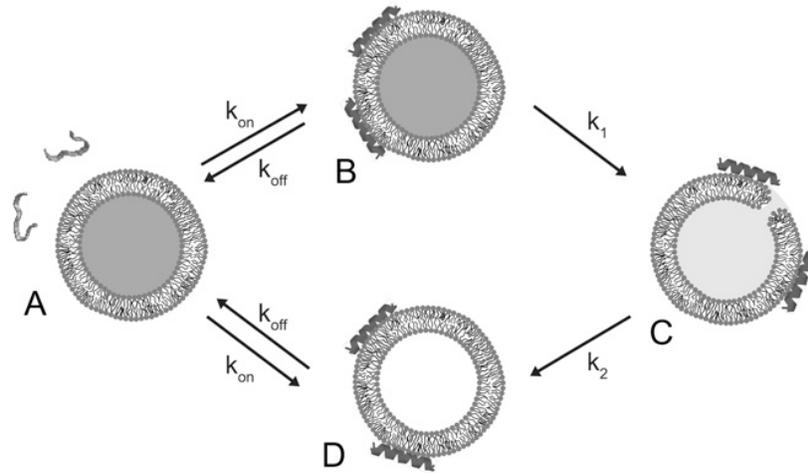


Figura 1.6 Modelo de interacción entre la cecropina A y vesículas sintéticas. A: P_w cecropina no estructurada en medio acuoso; B: P_{Full} , cecropina enlazada y plegada en vesículas llenas de fluoróforo; C: P^* ; cecropina en un poro; D: P_{Emp} , cecropina enlazada con vesículas vacías de fluoróforo [52]

Estos son los modelos cinéticos más representativos en torno al efecto de diferentes péptidos sobre vesículas sintéticas. Aunque existen muchos otros, estos son los únicos que intentan correlacionar la adsorción y mecanismo de acción del péptido

2. Planteamiento del problema

Los mecanismos de disrupción de membrana usados por un péptido antimicrobiano divergen y en muchas ocasiones ocurren simultáneamente. Sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que dependiendo del tipo de interacción péptido-membrana un mecanismo prevalece. En los modelos de perturbación predominan tres fenómenos: reordenamiento espacial del péptido por interacción con la membrana, formación de poros rígidos o semipermanentes por péptidos insertados en la fase lipídica, regiones de baja densidad (gaps) que rodean a los lípidos que interactúan directamente con los péptidos adsorbidos en la membrana. Todas estas estructuras obtenidas por la interacción péptido-lípido desbalancean el potencial de membrana y evita que rutas metabólicas necesarias para la supervivencia del organismo se lleven a cabo.

Varios modelos cuantitativos han sido propuestos para reproducir el comportamiento experimental antes mencionado, el cual plantea ecuaciones evolutivas en función de la liberación de un fluoróforo atrapado en vesículas por interacción con el péptido. En estos modelos subyace el objetivo de describir y entender el comportamiento colectivo del péptido y la membrana durante la formación de poros. Sin embargo, no todos los péptidos antimicrobianos catiónicos necesitan poros para ejercer su actividad, lo que imposibilita la aplicación de dichos modelos. Por esto es necesario establecer un modelo cinético con variables que no dependan de la formación de poros y que a su vez puedan ser cuantificadas. Esto permitiría aumentar el número de péptidos descritos por un modelo y no desarrollar un modelo específico para cada péptido estudiado.

3. Hipótesis

Los modelos cinéticos planteados hasta el momento no describen el comportamiento de péptidos catiónicos con actividad membranal diferente a la formación de poros. Plantear un modelo cinético en el cual la formación de poros no sea el factor indispensable en la formulación del mecanismo, abre la posibilidad de concebir a la membrana como un sistema decisivo en la actividad membranal de un péptido. Para establecer la importancia de la membrana, esta debe ser incluida dentro del modelo cinético de acción membranal. Lo anterior no es fácil de plasmar sobre ecuaciones diferenciales debido a la complejidad del sistema membrana-péptido, por lo tanto, es necesario establecer una relación fisicoquímica que caracterice a la membrana. Considerar a la membrana como un sólido poroso es un primer acercamiento a la solución de este problema y permite establecer parámetros que pueden ser incluidos en el modelo cinético. Para comprobar esta idea debemos reproducir el comportamiento experimental de un péptido catiónico que no genere poros en la membrana. Si el modelamiento es exitoso indica que el concebir a la membrana como participante activo en los mecanismos de actividad membranal es correcto y nuevos modelos debe ser desarrollado bajo este concepto. Si por el contrario el modelamiento es insatisfactorio es necesario establecer nuevos criterios de analogía fisicoquímica

4. Estrategia experimental

El objetivo general de este capítulo es plantear un modelo cinético de interacción péptido-membrana donde sus variables puedan ser fácilmente medibles. Para ello, se utilizaron técnicas computacionales y experimentales que validaron el modelo. La estrategia general consistió en:

1. **Planteamiento de un modelo cinético de interacción péptido-membrana.** Se desarrolló un modelo cinético planteado con base en la capacidad de adsorción de un péptido a una membrana lipídica, utilizando un equilibrio dinámico entre el péptido en solución y el péptido adsorbido y propiedades superficiales como factor de recubrimiento. El modelo planteado tiene solución analítica y está en función de la concentración no adsorbida de péptido por vesículas en solución.
2. **Selección y caracterización de un péptido catiónico de origen natural.** Se seleccionó un péptido que cumple con los parámetros fisicoquímicos estándar de los péptidos antimicrobianos catiónicos y de origen natural. Este péptido fue evaluado estructuralmente con el fin de determinar si este péptido adquiere alguna estructura cuando se encuentra en una fase donde hay una disminución de moléculas de agua de hidratación (Simulación de la Fase lipídica). La interacción con vesículas sintéticas fue realizada para determinar si liberaba o no un fluoróforo del interior de la vesícula.

3. **Evaluación del modelo cinético planteado.** Se determinó la variación de la concentración libre en solución de péptido en función de la concentración de péptido agregada, obteniendo isothermas de adsorción en fase líquida. La simulación de la solución analítica a las ecuaciones evolutivas fueron realizadas obteniendo una excelente concordancia entre los datos experimentales y teóricos.

5. Resultados y discusión

5.1 Modelo Cinético

El enfoque que plantea este modelo se resume en considerar que el péptido libre en solución y el adsorbido se encuentran en equilibrio dinámico. Además adopta variables de la química superficial como es la fracción de recubrimiento la cual es utilizada para sólidos que, por defectos superficiales, atraen moléculas a su interfase. En nuestro caso la fracción de recubrimiento (θ) es una magnitud que relaciona la cantidad de péptido adsorbido en función de la cantidad máxima de péptido que la membrana puede adsorber sin ser degradada o solubilizada. La mayoría de los modelos cinéticos llegan a la conclusión que la aglomeración de péptidos en la superficie facilita la formación de poros. Es por esto, que involucramos al parámetro θ , ya que depende explícitamente de la cantidad de péptido adsorbido sin importar el tipo de adsorción que se esté llevando a cabo. El uso de este parámetro ofrece una visión más detallada del fenómeno de adsorción contrario al usado en otros modelos que utilizan un parámetro enfocado a la formación del poro y no a la adsorción (modelo de cecropina y TP10 [10] [52]). Un ejemplo gráfico que puede aclarar los beneficios de usar θ es mostrado en la **Figura 1.7**. En el recuadro A observamos que la superficie tiene 5 posiciones libres (flechas) para 5 péptidos, que al ser adsorbidos ocupan esas posiciones. El valor de θ en estas condiciones sería igual a uno ya que todos los sitios disponibles están ocupados. Una suposición adicional es que al ocupar un sitio preferencial en la membrana, los péptidos están compensados energéticamente lo que impide la interacción con otros péptidos. Procesos como internalización de los péptidos en el espacio intermembranal se alejan de la idealidad y el parámetro θ tomaría valores superiores a uno y la isoterma de adsorción presentaría fenómenos similares a la histéresis (**Figura 1.7B**)

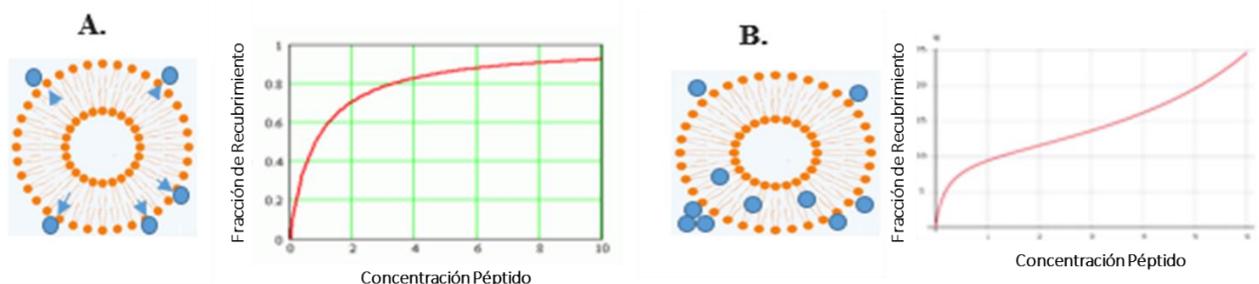
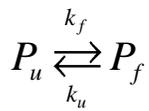


Figura 1.7 Modelo teorico. A. Comportamiento ideal de la membrana donde todo el péptido ocupa los sitios libres y el valor de θ es igual a uno. Las flechas indican posición en disponibles y los círculos son los péptidos que se **B.** Internalización de péptidos en el espacio intermembranal.

La internalización o aglomeración del péptido en la superficie de la membrana es el primer paso en el origen de poros, lo cual significa que el factor de recubrimiento es mayor a uno. Si la aglomeración se da en la superficie o en el espacio lipídico, podemos concebir esta aglutinación como el nacimiento de una nueva fase conformada por péptidos. Una fase es una región en el espacio donde todas las propiedades intensivas permanecen constantes y en este caso esta fase es constituida por péptidos que interactúan entre ellos. Esta aglomeración puede ser concebida como una nueva fase líquida en la superficie lipídica.

Formulación Matemática

El enlace reversible de un péptido en la membrana puede ser representado de la siguiente manera:



Donde P_u y P_f son la concentración de péptido en fase acuosa y P_f concentración de péptido en la vesícula, respectivamente. Las constantes k_u y k_f son constante de adsorción y constante de desorción.

Las ecuaciones diferenciales son:

$$\begin{aligned} \frac{dP_u}{dt} &= -k_f \theta P_u + k_s P_f \\ \frac{dP_f}{dt} &= k_f \theta P_u + k_s P_f \end{aligned}$$

Donde la velocidad de formación de configuración activa está directamente relacionada con la fracción de sitios desocupados en la membrana. El término fracción θ está directamente relacionado con la capacidad que tiene la vesícula de adsorber péptido, hasta cuando se empiecen a formar estructuras supramoleculares en ella θ . La constante k_f es la constante cinética directa (adsorción) y k_s la constante de desorción. La solución a las ecuaciones evolutivas presentadas se muestra a continuación.

La solución inicia considerando un tiempo inicial donde sólo está presente el péptido, con una concentración inicial, transcurrida un tiempo t las concentraciones P_u y P_f serán:

$$P_u = a - x \quad ; \quad P_f = x$$

Las ecuaciones que describen el modelo anterior en función del tiempo son:

$$-\frac{dP_u}{dt} = -\frac{d(a-x)}{dt} = k_f \theta (a-x) - k_s x$$

Donde Θ es la fracción de superficie cubierta por el péptido, y puede ser definida como la cantidad de péptido adsorbida sobre la cantidad de péptido que soporta la membrana C. Esta última es una constante y puede ser calculada a partir de isotermas de adsorción, por lo tanto podemos definir a θ como:

$$\theta = \frac{x}{C}$$

Remplazando obtenemos

$$\frac{dx}{dt} = k_f \frac{x}{C} (a - x) - k_s x$$

El coeficiente $\frac{k_f}{C} = k_f^C$ es una constante, Asumiendo un cambio infinitesimal podemos resolver la ecuación:

$$\frac{dx}{k_f^C x a - k_f^C x^2 - k_s x} = dt$$

La anterior ecuación tiene una solución ya establecida para límites definidos

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{k_f^C x a - k_f^C x^2 - k_s x} = \int_{t=0}^t dt$$

El resultado obtenido es:

$$\ln(x) - \ln(k_f^C x - (k_f^C a - k_s)) - \ln(x_0) - \ln((k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))) = (k_f^C a - k_s)t$$

Esta ecuación es simplificada de la siguiente manera:

$$\ln \left(\frac{\frac{x}{k_f^C x - (k_f^C a - k_s)}}{\frac{x_0}{(k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))}} \right) = (k_f^C a - k_s)t$$

$$\frac{x}{(k_f^C x - (k_f^C a - k_s))} = \frac{x_0}{(k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))} e^{(k_f^C a - k_s)t}$$

$$x = k_f^C x D e^{(k_f^C a - k_s)t} - (k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}$$

$$x = - \frac{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}}{(1 - k_f^C D e^{(k_f^C a - k_s)t})}$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C D e^{(k_f^C a - k_s)t}}{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}} - \frac{1}{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}}$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C D}{(k_f^C a - k_s) D} - \frac{e^{-(k_f^C a - k_s)t}}{(k_f^C a - k_s) D}$$

Colocando los valores de forma explícita, obtenemos:

$$\frac{1}{P_f} = \frac{k_f^C \left(k_f^C [P_f]_o - (k_f^C [P_u]_o - k_s) \right)}{\left(k_f^C [P_u]_o - k_s \right) [P_f]_o} \left(1 - \frac{1}{k_f^C} e^{-(k_f^C [P_u]_o - k_s)t} \right)$$

La cual puede ser reducida a:

$$P_f = \frac{1}{B - G e^{-kt}}$$

Donde B , G y k son:

$$B = \frac{k_f^C \left(k_f^C [P_f]_o - (k_f^C [P_u]_o - k_s) \right)}{\left(k_f^C [P_u]_o - k_s \right) [P_f]_o}$$

$$G = B \frac{1}{k_f^C}$$

$$k = k_f^C [P_u]_o - k_s$$

La forma reducida permite determinar B por regresión exponencial del inverso de la cantidad de péptido contra el tiempo; la determinación k_f y k_s es determinada por la regresión lineal de k contra $[P_u]_o$. El análisis conceptual del modelo nos permite concluir que:

Primero: La velocidad de adsorción del péptido y conformación activa depende tanto de las constantes cinéticas como de parámetros que regulan el fenómeno de adsorción. Parámetros como capacidad de adsorción están relacionados con el modelo de interacción del péptido porque si la membrana acepta más péptido del que ella fisicoquímicamente esta apta para aceptar, se presentaran aglomeración. La aglomeración es el primer paso a la formación de poros en la membrana

Segundo: A tiempos muy cercanos a cero, la evolución del péptido adsorbido en la membrana está en términos del inverso de $B-G$, indicando que el fenómeno está gobernado por las concentraciones de péptido en solución y adsorbido.

Tercero: A tiempos muy grandes, cercanos al infinito, la evolución está dirigida por el factor B que depende a su vez de P_f . Esto significa que la desorción del péptido es plausible y afecta la evolución del sistema.

Cuarto: Si el valor de k es positivo, significa $k_f \gg k_s$, lo que indica que a tiempos iniciales la velocidad del proceso está dirigida por esta constante. Por ende, se puede pronosticar que el sistema presente un fuerte decaimiento de la concentración de péptido en solución y luego un posterior equilibrio.

Simulación numérica de las ecuaciones planteadas en el modelo cinético

Para entender mejor el comportamiento del sistema podemos realizar las siguientes aproximaciones límite. Cuando la k_f es mayor a k_s indica que existe una tendencia general a la absorción del péptido sobre la vesícula y la concentración de péptido desplegado en solución acuosa es muy baja. Bajo estas condiciones las relaciones entre parámetros adquieren las siguientes restricciones donde B (superior a uno) > G (menor a uno). Sin embargo el valor de k puede tener valores mayores a B, intermedios a B y G o menores que G. Cuando k es mayor que los parámetros B y G la adsorción del péptido es rápida y tiende rápidamente a un valor de máxima cantidad de péptido adsorbida. (**Figura 1.8**). Valores inferiores de k se muestra una tendencia general en la disminución de péptido adsorbido. Cuando k adquiere el mínimo valor, el péptido no es adsorbido, esto se explica utilizando la siguiente ecuación

$$k = k_f^C [P]_o - k_s$$

Para que k sea valor muy bajo significa que k_s está cercano al valor de $k_f [P]$ donde $[P]$ es la concentración inicial de péptido, esto significa que predomina la desorción, lo que explica la tendencia de la gráfica. Además es importante establecer que la solución analítica de los modelos tiene una restricción donde e_s no puede ser mayor a $k_f^C [P]_o$.

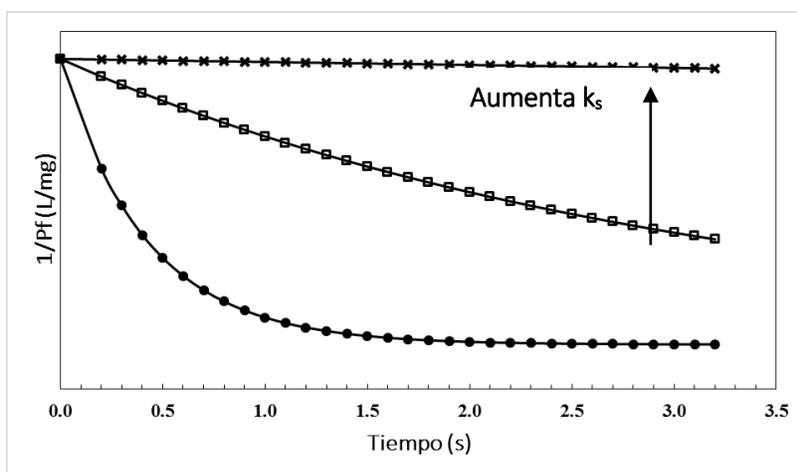


Figura 1.8 Simulación numérica de la cantidad de péptido adsorbido en función del tiempo con base en el modelo establecido en este proyecto. Cuando la constante de adsorción k_f es muy grande podemos establecer tres escenarios: **1.** -●- los valores de las constante es B = 0.5, G = 0.03, $k = 2.3 \text{ s}^{-1}$. **2.** -□- los valores de las constante es B = 0.5, G = 0.03, $k = 0.3 \text{ s}^{-1}$. **3.** -x- los valores de las constante es B = 0.5, G = 0.03, $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$. Las curvas fueron simuladas en un programa basado en DLSODE Fortran 77 y Origin 5.0.

5.2 Diseño del péptido prueba

Es conocido que el C-terminal de las citosinas y quimosinas interacciona con la superficie de las células en forma de ancla, y el N-terminal tiene como función interaccionar con un receptor en la membrana para iniciar una respuesta inmunitaria. Nosotros analizamos 17 citosinas y quimosinas obtenidas a partir de PDB; se agruparon según la secuencia de aminoácidos y estructura secundaria. El análisis de la secuencias fue hecho a través de los diferentes programas como CLUSTALW [56] con una matriz tipo BLOSUM62 [57].

La secuencia consenso fue APXIKKIIKKX la cual agrupo a 3 C-terminales de diferentes proteínas, como 1O7Y, 1NAP, 1F9R. Un posterior de análisis de capacidad de formación de alfa-hélices en ambientes acuosos, carga, punto isoelectrico y otros parámetros fisicoquímicos fue evaluado según AGADIR [53], y herramientas de EXPASY (SIB Bioinformatics Resource Portal). **Tabla 1.2**

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de proteínas que se agrupan en la secuencia consenso (APXIKKIIKKXLX) helicidad, carga, punto isoelectrico, momento hidrofóbico

| C-terminal de la Proteína (Péptidos) | Secuencia | % Helicidad Calculada a partir de AGADIR | Carga | Punto Isoeléctrico | Momento Hidrofóbico |
|--------------------------------------|-----------------|--|-------|--------------------|---------------------|
| 1O7Y | ESKAIKNLLKAVS | 0.71 (Alta) | 2.0 | 10.33 | 0.36 |
| 1NAP | APRIKKIVQKKLAGD | 0.12 (Baja) | 4.0 | 11.02 | 0.20 |
| 1F9R | APLYKKIIKKLLS | 0.12 (Baja) | 3.0 | 10.33 | 0.34 |

Los valores de porcentaje de helicidad para los péptidos 1F9R y 1NAP son bajos pero debemos recordar que este parámetro es calculado a partir del programa AGADIR, el cual parametriza esto desde variables calculadas en fase acuosa [53]. Cuando el péptido está en la interfase sufre un proceso similar a la deshidratación y, bajo estas condiciones, se aumenta la probabilidad de adquirir estructuras alfa-hélices. Un experimento que permite validar esta predicción, utiliza dicroísmo circular y compuestos como el trifluoroetano TFE. El primero registra los cambios de estructura secundaria y el TFE genera ambientes similares a la membrana lipídica. La moléculas de TFE atrapan a la moléculas de agua que conforman la atmosfera de hidratación, disminuyendo los puentes de hidrogeno e interacciones electrostáticas agua-péptido. Esta ausencia de enlaces promueve la formación de interacciones entre residuos que conforman la estructura primaria del péptido, simulando las características de la interfase péptido-membrana o la fase lipídica. Los resultados obtenidos muestran que 1O7Y, 1NAP no cambian su estructura aun cuando las concentraciones de TFE aumentan; caso contrario al 1F9R cuya

helicida aumenta a medida que aumenta la concentración de TFE. (**Figura 1.9**). La ausencia de alfa hélices para los péptidos 107Y y 1NAP es debida a la tendencia general de estos péptidos a la aglomeración en solución por su baja solubilidad.

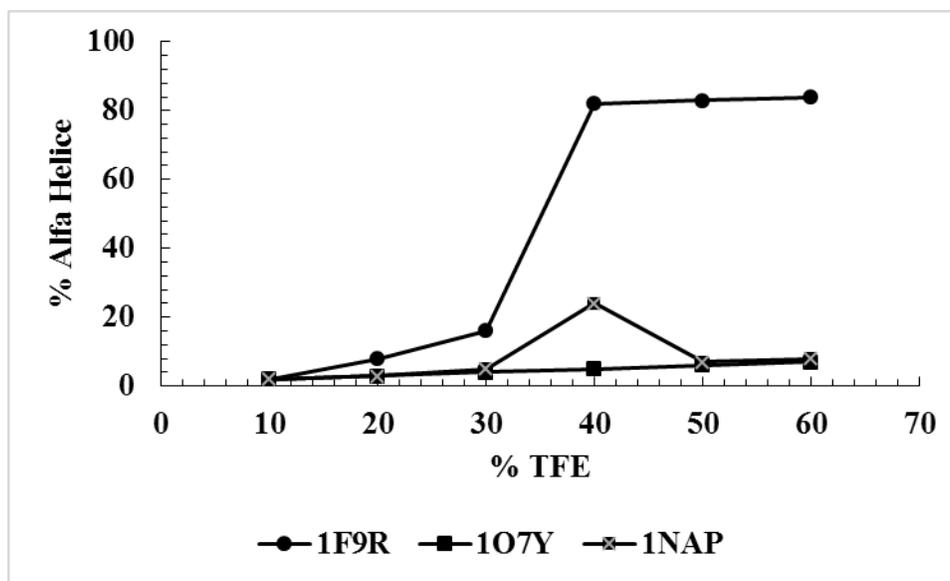


Figura 1.9 Porcentaje de alfa hélices de los péptidos seleccionados por interacción con TFE. El resultado muestra que 1F9R tiende a la formación de alfa-hélice en mayor grado que los péptidos 107Y y 1NAP.

Esta característica estructural del 1F9R combinada con los parámetros fisicoquímicos mostrados en la **Tabla 1.2**, indica que el péptido es catiónico con pocos aminoácidos, lo que dificulta la formación de poros en la membrana pero con tendencia formar alfa-hélices. Por estas características el C-terminal del 1F9R fue seleccionado como primer modelo de estudio para el modelo cinético planteado.

5.3 Análisis del comportamiento del Péptido

Ensayos de liberación de calceína

Como se muestra en la **Figura 1.10** el péptido 1F9R no indujo liberación de calceína desde las LUV en ningún rango de concentración trabajado. En las vesículas con composición similar a las membranas de mamífero se utilizó una relación 2:3:1 de palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidil-etanol-amina (DPPE) y colesterol (Ch) y para bacterias Gram-negativas dipalmitoil-fosfatidil-etanol-amina (DPPE). Esto indica que el péptido no puede formar poros en la membrana o perturbaciones significativas que permitan que la calceína sea liberada, lo que se adecua al modelo de ensayo.

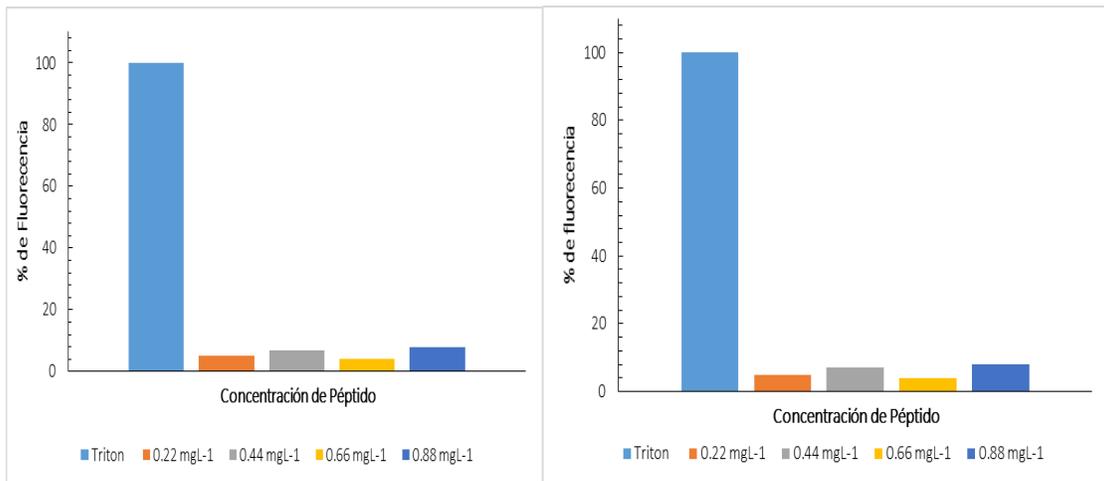


Figura 1.10 Porcentaje de calceína liberada por acción del péptido 1F9R a diferentes concentraciones. La grafica de lado derecho muestra la interacción péptido con LUVs de composición similar a las membranas de mamífero. La gráfica izquierda muestra la interacción del péptido con LUVs de composición a las membranas de bacteria. En ninguna de estas gráficas se muestra que el péptido pueda perturbar la membrana.

Actividad Antimicrobiana

Se comprobó el efecto antimicrobiano del 1F9R sobre bacterias y levaduras. La **Figura 1.11** muestra que el aumento de la concentración de péptido inhibe el crecimiento tanto de levaduras como de *E. coli*. Las curvas presentan además un aumento de colonias después de un tiempo, esto es debido al carácter bacteriostático del péptido 1F9R para *E. coli* y *S. cerevisiae*. Para *C. glabrata* el péptido es un agente antimicrobiano ya que inhibe por completo el crecimiento.

La microscopía electrónica **Figura 1.12** muestra que en el caso de *E. coli* y *S. cerevisiae* el péptido genera degradación celular y posible fibrillas que den origen a un biofilm. El biofilm es un mecanismo de protección de bacterias que explica el efecto bacteriostático del péptido. En el caso de *C. glabrata* se muestra una mayor concentración de degradación celular apoyando los datos de curva de crecimiento.

Modelo Cinético

El modelo de enlace de 1F9R sobre vesículas fue medido por disminución de la concentración del péptido en solución a medida que era adsorbido por las vesículas lipídicas. Esto fue realizado tomando muestras a diferentes tiempos de la fase líquida y determinando la concentración de péptido remanente por HPLC. El comportamiento de la curva evidencia claramente que a grandes tiempos existe un equilibrio dinámico entre la adsorción y desorción del péptido como se muestra en la **Figura 1.13 A**.

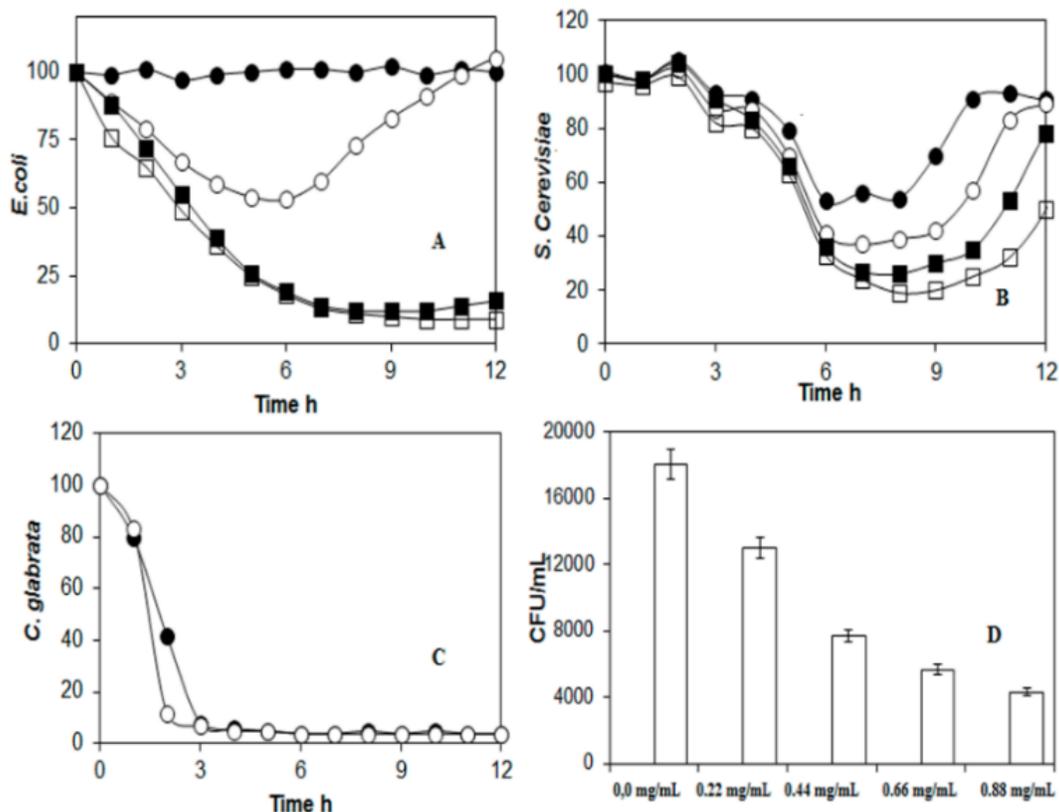


Figura 1.11 Porcentaje de supervivencia de diferentes organismos contra el 1F9R **A.** *E. coli* **B.** *S. cerevisiae*; en ellos se observa un efecto bacteriostático (El crecimiento se restablece) **C** *C. glabrata* **D** CFU (Unidades formadoras de colonias vs concentración de péptido) para *C. glabrata*; los resultados muestran que el péptido inhibe el crecimiento. Los marcadores representan las diferentes concentraciones utilizadas (-●-) 0.22 mg/mL de péptido. (-○-) 0.44 mg/mL de péptido. (-■-) 0.66 mg/mL de péptido. (-□-) 0.88 mg/mL de péptido.

La isoterma de adsorción muestra un comportamiento similar al obtenido cuando un material tiene sitios específicos de unión entre el adsorbato y el adsorbente (Isoterma de Langmuir) como se muestra en la **Figura 1.13B**. Esto significa que el péptido interacciona con la vesícula pero sin llegar a la formación de poros, dato apoyado en los resultados de liberación de calceína.

Las constantes de velocidad obtenidas a partir de los datos experimentales permitieron simular el fenómeno de adsorción y simular los datos experimentales **Figura 1.13 A**. El modelo teórico con respecto al modelo experimental tiene una correlación cercana al 97%, demostrando que el modelo puede reproducir el comportamiento de péptidos catiónicos de bajo peso molecular que no generan poros y tienen actividad antimicrobiana.

Los valores de las constantes obtenidas del modelo cinético planteado son mostrados en la **Tabla 1.3**. La magnitud de las constantes obtenidas sorprende por su valor, el cual es muy pequeño a comparación para constantes reportadas en otros modelos. Obtener un valor muy grande en una constante limita la interpretación y

por ende la explicación del fenómeno y reducen la argumentación. Es por esto que la mayoría de los modelos al obtener este valor coinciden en que el modelo de acción está gobernado por procesos difusivos que obedecen la ley de Fick. Lo anterior significa que, sin importar la cantidad de péptido que haya sido adsorbida, la vesícula ejerce la misma fuerza de interacción en todo momento. Lo anterior no está acorde con la fenomenología observada, implica que el péptido en solución siempre sería adsorbido y péptido remanente no existiría, sin embargo los datos demuestran lo contrario. Obtener valores significativamente menores de la constantes cinéticas indica que el modelo propuesto puede involucrar las interacciones electrostáticas y otro tipo de procesos.

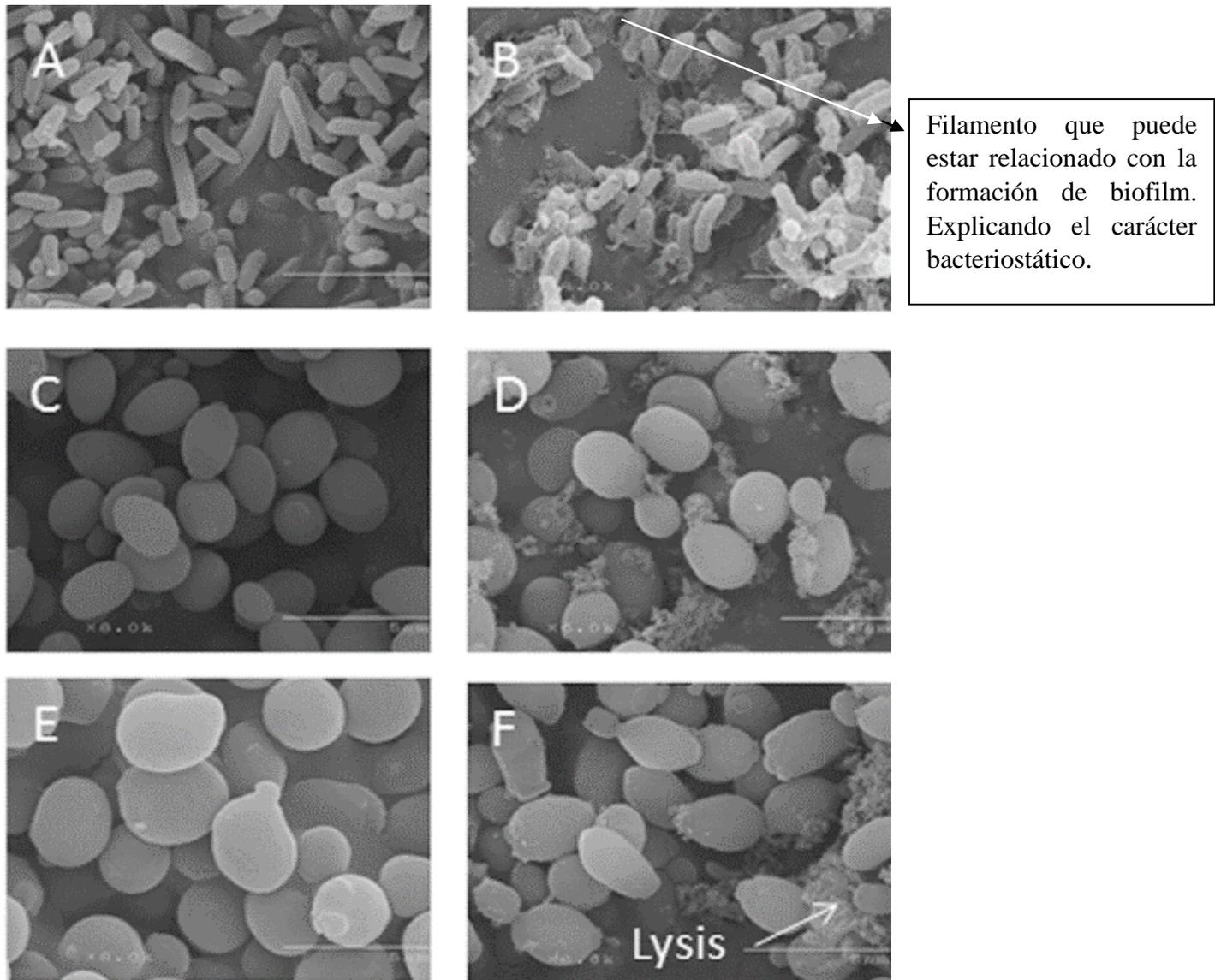


Figura 1.12 Microscopía electrónica. Donde A, C y D son los controles (sin interacción con péptido) de los organismos A. *E.coli* B. *S. cerevisiae* C. *C glabrata*. Las figuras B, D y F muestran el efecto por interacción con el péptido 1F9R a una concentración de 0.300 mg/mL. Se observa lisis celular y formación de biofilm.

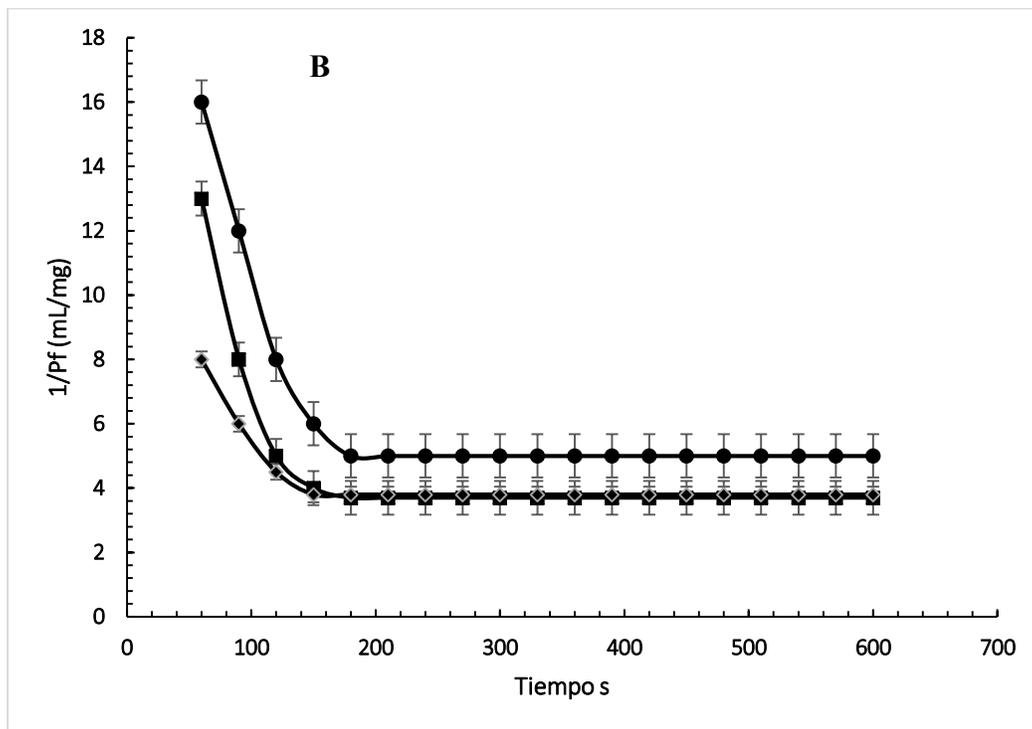
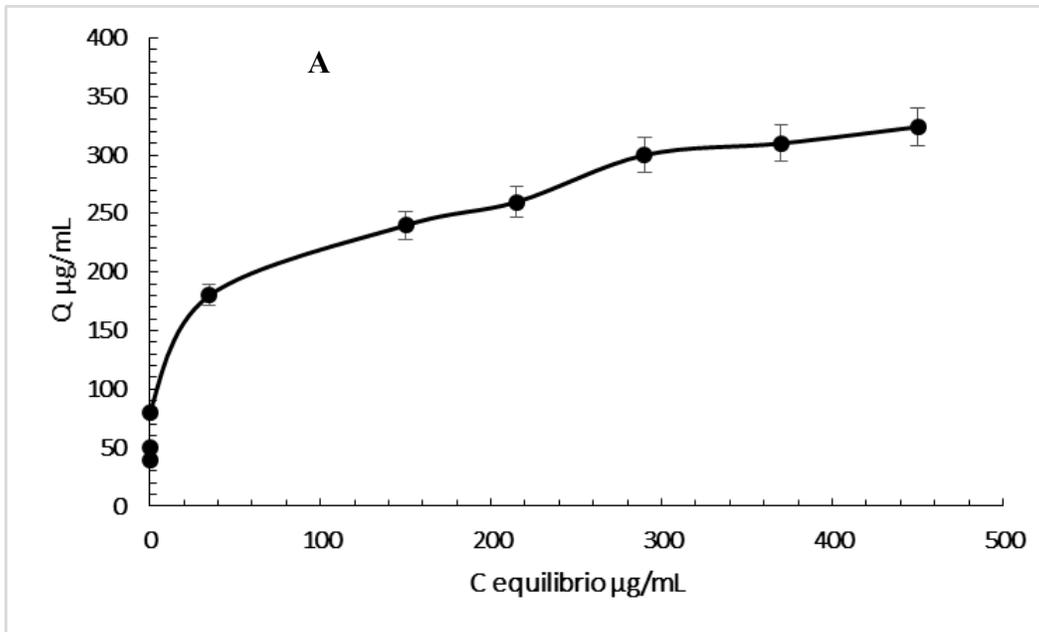


Figura 1.13 Isotherma de adsorción del péptido 1F9R sobre vesículas de PE (fosfatidiletanolamina) y Adsorción del péptido en función del tiempo sobre vesículas PE. Los puntos son los datos experimentales y la línea representa los datos teóricos basados en el modelo. **A.** Isotherma de adsorción donde Q concentración de péptido adsorbida (Concentración inicial - Concentración final) y C_{eq} es la concentración en solución. **B.** Cantidad de Péptido adsorbida en función del tiempo. Se observa que existe un equilibrio dinámico entre el péptido adsorbido y el péptido en solución (Debido a que siempre existe una concentración remanente sin importar que el tiempo pase), por último la forma de la isoterma nos dice que tiene un comportamiento similar a una isoterma de Langmuir.

Tabla 1.3 Constantes de desorción y adsorción para vesículas tipo mamífero (relación 2:3:1 de palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidilethanolamine (DPPE) and colesterol (Ch)) y bacteria foafatidiletanolamina. Los valores obtenidos están lejos de los valores propios de difusión simple que se muestran en otros modelos; esto indica que el valor de estas constantes depende del modo de acción del péptido y otros parámetros fisicoquímicos.

| Concentración Péptido +/-0.050 mg/ml | <i>K</i> | <i>B</i> | <i>G</i> | $M^{-1}s^{-1}/C$ | $k_u s^{-1}$ | R^2 |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|------------------|--------------|-------|
| 0.250 | 0.01065 | 0.24197 | 0.20589 | 0.0174 | 0.0065 | 0.97 |
| 0.400 | 0.01408 | 0.33408 | 0.36321 | | | 0.99 |
| 0.500 | 0.1489 | 0.33265 | 0.37462 | | | 0.99 |

Bacteria:

| Concentración Péptido +/-0.50 mg/ml | <i>K</i> | <i>B</i> | <i>G</i> | $M^{-1}s^{-1}/C$ | $k_u s^{-1}$ | R^2 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|------------------|--------------|-------|
| 0.250 | 0.01107 | 0.2101 | 0.20589 | 0.0254 | 0.0045 | 0.99 |
| 0.400 | 0.01312 | 0.3251 | 0.36321 | | | 0.98 |
| 0.500 | 0.1321 | 0.3185 | 0.37462 | | | 0.97 |

5.4 Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular ofrecen una perspectiva detallada de la interacción péptido-membrana a nivel microscópico. Sin embargo, la compleja naturaleza de estos sistemas requiere de simplificaciones en el modelo de simulación, por ende los resultados obtenidos deben ser analizados con precaución. Los resultados obtenidos son mostrados en la **Figura 1.14**.

La interacción del péptido con la membrana genera un cambio de conformación de éste. El cambio inicia con la exposición de las argininas hacia la membrana interaccionando con los oxígenos pertenecientes al grupo fosfato a una distancia promedio de 3.5nm propia de las interacciones de tipo Coulombicas.

El grado de penetración del péptido en la membrana está en el orden de $2.2 \pm 0.7 \text{ \AA}$ (a 50 ns) y de $1.1 \pm 0.6 \text{ \AA}$ (a 10ns). Una observación muy importante es que el péptido no se sumerge completamente en el núcleo, se mantiene cerca de la primera capa de hidratación en concordancia con el modelo cinético planteado anteriormente.

El efecto del cambio conformacional del péptido en la membrana lo evaluamos con el desplazamiento lateral de los lípidos en la membrana. Inicialmente el desplazamiento permanece aproximadamente constante,

con una pendiente de $3.8 \times 10^{-5} \text{ nm}^2/\text{ps}$, que es un valor cercano al obtenido para membranas en condiciones experimentalmente (Apéndice capítulo I, **Figura S1**). Cuando se llega a 50 ns (**Figura 1.14 A (10 ns), B (50 ns) y Figura S2**), tiempo en el cual el péptido alcanza una conformación aleatoria pero estable, el desplazamiento disminuye esto indica que el péptido hace que la membrana sea más rígida, lo que, en términos biológicos, tiene como consecuencia una dificultad en la adquisición de nutrientes, en la comunicación celular.

Lo anterior puede conducirnos a entender el mecanismo de acción del péptido 1F9R, cuando el péptido interacciona genera columnas estáticas en la membrana. Este fenómeno ya ha sido reportado para péptidos como la castelina, donde se analiza la dinámica de la membrana por RMN encontrando disminución en la velocidad de difusión de los lípidos [54].

Los parámetros de orden de deuterio sirven para analizar las propiedades físicas de la membrana. Cada parámetro de orden está definido como una magnitud que al variar permite determinar la movilidad o desorden de una molécula. Este mide un ángulo coseno entre los grupos metileno o metilo de una de las cadenas de alcanos presentes en el lípido, con un vector normal al plano de la membrana, a mayores valores menor movilidad de la cadena. En la **Figura 1.14 F** observamos que a medida que el tiempo avanza mayor es el valor del parámetro y por ende menor movilidad lo que refuerza el modelo cinético y los ensayos experimentales realizados.

La estructura inicial del péptido 1F9R no se conserva durante la simulación de dinámica molecular y adquiere una estructura aleatoria (**Figura S3 apéndice capítulo 1**). Este cambio conformacional permite estabilizar las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos catiónicos y los grupos fosfato presentes en los lípidos, pero no le permite insertarse en la fase lipídica. Esto está en concordancia con algunos estudios que colocan como requisito fundamental para la formación de poros en la membrana un cambio estructural del péptido hacia alfa-hélices o en su defecto estructuras secundarias que le permitan diferenciar cargas polares de no-polares en la estructura [55]; Aunque difiere en que se predice que estructuras de tipo aleatorio no perturban la membrana y por ende no tienen actividad antimicrobiana. Nosotros demostramos que, por el contrario, este tipo de péptidos si puede inhibir el crecimiento y puede tener comportamiento bacteriostático e incluso antimicrobiano para *C. glabrata* **Figura 1.11 y Figura 1.12**. Sugerimos que 1F9R adopta una conformación activa tras la interacción con grupos cargados negativamente en la membrana. El péptido (1F9R) está dando lugar a la formación de dominios rígidos, localizados alrededor del péptido. Estas zonas donde la movilidad y velocidad transversal de los lípidos es alterada podrían promover la formación de gaps, lo que altera y desestabiliza la membrana.

El cambio conformacional del péptido en la membrana es un requisito esencial en el mecanismo de interacción y por ende en todos los fenómenos secundarios que de este se generen. Este planteamiento no es nuevo y la mayoría de los modelos de interacción y cinéticos usan ese argumento para justificar el fenómeno. La dependencia del cambio conformacional del péptido implica que el paso más importante en el mecanismo es el

cambio conformacional, sin embargo esta variable no es incluido en ningún modelo cinético. Plantear un modelo en términos de este parámetro es muy difícil ya que el modelo cinético se basa en cambios macroscópicos y cambios en conformación es microscópico, lo que dificulta un planteamiento riguroso del modelo. Por esto surge la necesidad de evaluar el modelo cinético y mecanismos de interacción con péptidos que tengan propiedades de péptido catiónico y restringidos estructuralmente. Esta alternativa permite establecer el verdadero efecto de la conformación y si los modelos cinéticos dependen en sí de este cambio, lo que obligaría a los nuevos modelos a ser replanteados.

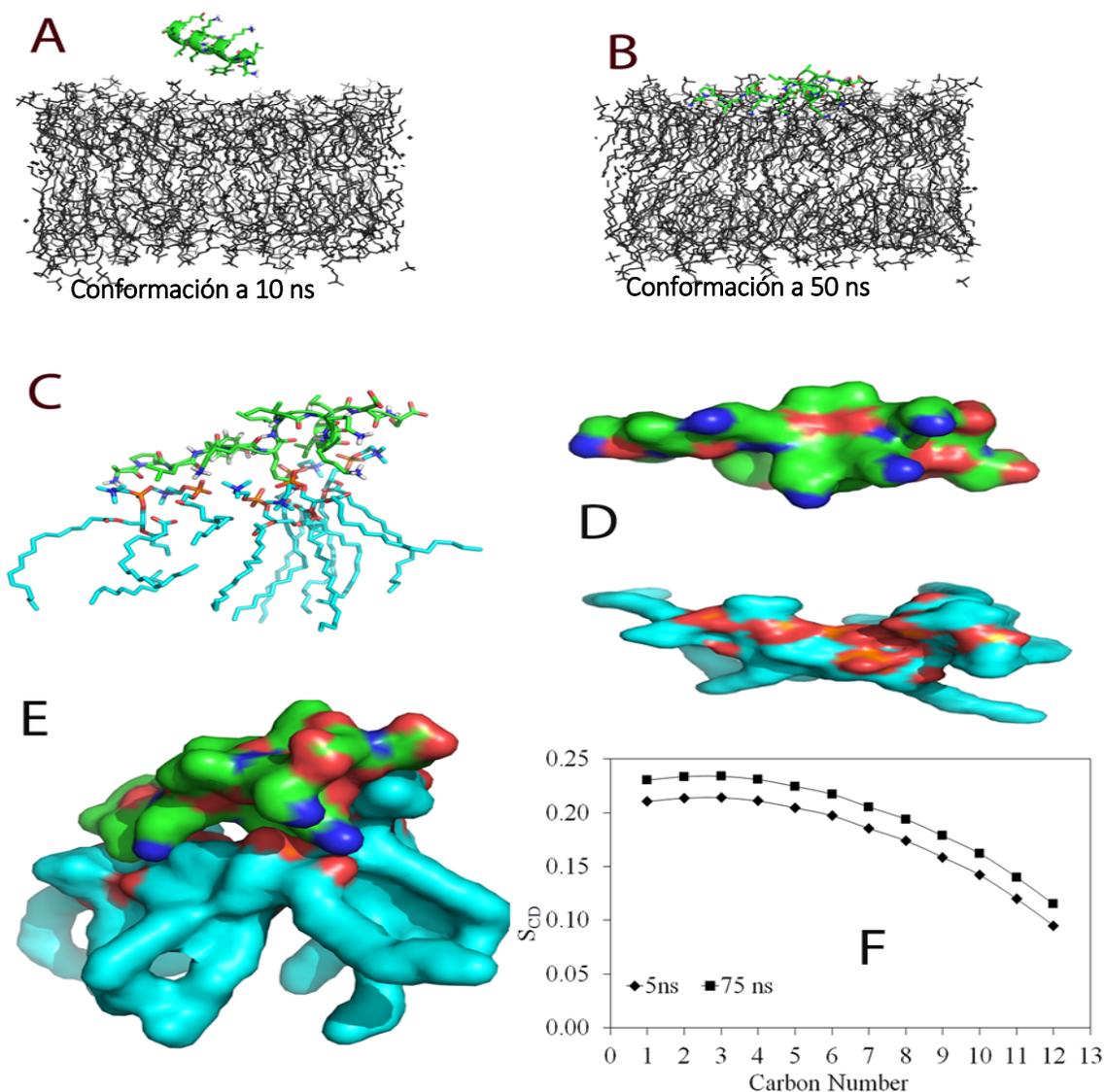


Figura 1.14 Dinámica molecular del péptido seleccionado 1F9R. (A-B) Fotografías del péptido a 10ns y 50 ns. **(C)** Forma de enlace del péptido a la membrana. **(D-E)** Superficie de interacción péptido-lípido. **(F)** Parámetro de orden de las cadenas lipídicas.

Los valores de las constantes cinéticas de adsorción y desorción reportados a partir del modelo planteado difieren significativamente de los valores propios de la difusión. Esto significa que el modelo es sensible al fenómeno de interacción membrana-péptido a diferencia de los demás modelos que encuentran que el fenómeno de interacción está gobernado por la difusión (interacción electrostática). El tipo de isoterma obtenido nos indica que el péptido es adsorbido tiene sitios puntuales en la membrana y cuando estos son ocupados una concentración remanente de péptido en solución entra en equilibrio dinámico con la vesícula.

6. Conclusiones

Aunque el cambio conformacional del péptido a una estructura tipo alfa-hélice no se descarta, es poco probable; sin embargo, la actividad del péptido está dirigida por este cambio estructural.

1. Péptidos catiónicos con secuencias menores a 19 aminoácidos y sin formación de alfa-hélices por interacción membrana pueden tener actividad antimicrobiana.
2. El modelo cinético involucra de manera explícita a un parámetro de la membrana celular, como es el factor de recubrimiento. La aplicación de este modelo nos permite sugerir que el modelo de adsorción está relacionado con el modelo de acción peptídica.
3. Los valores de las constantes cinéticas descartan la posibilidad que el modelo de acción propuesto para el péptido sea dirigido por procesos de difusión.
4. El modelo debe ser valorado con péptidos que no puedan cambiar su estructura (restringidos estructuralmente) y péptidos libres de restricciones estructurales, para comparar su comportamiento el comportamiento frente a vesículas.

7. Bibliografía

1. Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1, 156–64.
2. Guarnieri, D., Falanga, A., Muscetti, O., Tarallo, R., Fusco, S., Galdiero, M., Galdiero, S., and Netti, P. a. (2013). Shuttle-mediated nanoparticle delivery to the blood-brain barrier. *Small* 9, 853–862.
3. Ferris, D. P., Lu, J., Gothard, C., Yanes, R., Thomas, C. R., Olsen, J. C., Stoddart, J. F., Tamanoi, F., and Zink, J. I. (2011). Synthesis of biomolecule-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted hydrophobic drug delivery to cancer cells. *Small* 7, 1816–1826.
4. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1173–1176.

5. Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1467*, 165–176.
6. Delaroche, D., Aussedat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2007). Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.* *79*, 1932–1938.
7. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* *269*, 10444–10450.
8. Chem, J. B. (1997). CELL BIOLOGY AND METABOLISM: A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and A. *272*, 16010–16017.
9. Wender, P. a, Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13003–13008.
10. Yandek, L. E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, U., and Almeida, P. F. F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.* *92*, 2434–2444.
11. Yandek, L. E., Pokorny, A., and Almeida, P. F. F. (2008). Small changes in the primary structure of transportan 10 alter the thermodynamics and kinetics of its interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* *47*, 3051–3060.
12. Henriques, S. T., Castanho, M. a R. B., Pattenden, L. K., and Aguilar, M. I. (2010). Fast membrane association is a crucial factor in the peptide pep-1 translocation mechanism: a kinetic study followed by surface plasmon resonance. *Biopolymers* *94*, 314–322.
13. Henriques, S. T., and Castanho, M. a R. B. (2005). Environmental factors that enhance the action of the cell penetrating peptide pep-1: A spectroscopic study using lipidic vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1669*, 75–86.
14. Sharonov, A., and Hochstrasser, R. M. (2007). Single-molecule imaging of the association of the cell-penetrating peptide Pep-1 to model membranes. *Biochemistry* *46*, 7963–7972.
15. Säälük, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, Ü., and Pooga, M. (2011). Penetration without cells: Membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *J. Control. Release* *153*, 117–125.
16. Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M., and Temsamani, J. (2001). Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide: Role of lipid-binding affinity. *Eur. J. Biochem.* *268*, 1304–1314.
17. Drin, G., Démé, H., Temsamani, J., and Brasseur, R. (2001). Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry* *40*, 1824–1834.
18. Caesar, C. E. B., Esbjörner, E. K., Lincoln, P., and Nordén, B. (2006). Membrane interactions of cell-penetrating peptides probed by tryptophan fluorescence and dichroism techniques: Correlations of structure to cellular uptake. *Biochemistry* *45*, 7682–7692.
19. Persson, D., Thorén, P. E. G., Lincoln, P., and Nordén, B. (2004). Vesicle membrane interactions of penetratin analogues. *Biochemistry* *43*, 11045–11055.
20. Thorén, P. E. G., Persson, D., Esbjörner, E. K., Goksör, M., Lincoln, P., and Nordén, B. (2004). Membrane Binding and Translocation of Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* *43*, 3471–3489.
21. Persson, D., Thorén, P. E. G., Herner, M., Lincoln, P., and Nordén, B. (2003). Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes. *Biochemistry* *42*, 421–429.
22. Walrant, A., Correia, I., Jiao, C. Y., Lequin, O., Bent, E. H., Goasdoué, N., Lacombe, C., Chassaing, G., Sagan, S., and Alves, I. D. (2011). Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1808*, 382–393.

23. Binder, H., and Lindblom, G. (2003). Interaction of the Trojan peptide penetratin with anionic lipid membranes? a calorimetric study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *5*, 5108.
24. Salamon, Z., Lindblom, G., and Tollin, G. (2003). Plasmon-waveguide resonance and impedance spectroscopy studies of the interaction between penetratin and supported lipid bilayer membranes. *Biophys. J.* *84*, 1796–1807.
25. Wieprecht, T., and Seelig, J. (2002). Isothermal titration calorimetry for studying interactions between peptides and lipid membranes. *Pept. Interact.* *52*, 31–56.
26. Ciobanasu, C., Harms, E., Tünnemann, G., Cardoso, M. C., and Kubitscheck, U. (2009). Cell-penetrating HIV1 TAT peptides float on model lipid bilayers. *Biochemistry* *48*, 4728–4737.
27. Ciobanasu, C., Peter Siebrasse, J., and Kubitscheck, U. (2010). Cell-penetrating HIV1 TAT peptides can generate pores in model membranes. *Biophys. J.* *99*, 153–162.
28. Ziegler, A., Li Blatter, X., Seelig, A., and Seelig, J. (2003). Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry* *42*, 9185–9194.
29. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* *271*, 18188–18193.
30. Duchardt, F., Ruttekolk, I. R., Verdurmen, W. P. R., Lortat-Jacob, H., Bürck, J., Hufnagel, H., Fischer, R., van den Heuvel, M., Löwik, D. W. P., Vuister, G. W., et al. (2009). A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency. *J. Biol. Chem.* *284*, 36099–36108.
31. Almeida, P. F., and Pokorny, A. (2009). Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: From kinetics to thermodynamics. *Biochemistry* *48*, 8083–8093.
32. Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004). Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis. *Biochemistry* *43*, 1449–1457.
33. Eiríksdóttir, E., Konate, K., Langel, U., Divita, G., and Deshayes, S. (2010). Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim. Biophys. Acta* *1798*, 1119–1128.
34. Magzoub, M., Eriksson, L. E. G., and Gräslund, A. (2003). Comparison of the interaction, positioning, structure induction and membrane perturbation of cell-penetrating peptides and non-translocating variants with phospholipid vesicles. *Biophys. Chem.* *103*, 271–288.
35. Magzoub, M., Eriksson, L. E. G., and Gräslund, A. (2002). Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: Effects of surface charge and peptide concentration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1563*, 53–63.
36. Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1462*, 55–70.
37. Joanne, P., Galanth, C., Goasdoué, N., Nicolas, P., Sagan, S., Lavielle, S., Chassaing, G., El Amri, C., and Alves, I. D. (2009). Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1788*, 1772–1781.
38. Hecce, H. D., Garcia, a. E., Litt, J., Kane, R. S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, a., and Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys. J.* *97*, 1917–1925.
39. Hecce, H. D., and Garcia, A. E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20805–20810.
40. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* *35*, 11361–11368.

41. Huang, W. N., Sue, S. C., Wang, D. S., Wu, P. L., and Wu, W. G. (2003). Peripheral binding mode and penetration depth of cobra cardiotoxin on phospholipid membranes as studied by a combined FTIR and computer simulation approach. *Biochemistry* *42*, 7457–7466.
42. Yeaman, M. R., and Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* *55*, 27–55.
43. Rausch, J. M., Marks, J. R., and Wimley, W. C. (2005). Rational combinatorial design of pore-forming beta-sheet peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10511–10515.
44. Ambroggio, E. E., Separovic, F., Bowie, J., and Fidelio, G. D. (2004). Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin. *Biochim. Biophys. Acta* *1664*, 31–7.
45. Datrie, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., and Bienert, M. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* *35*, 12612–12622.
46. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., and Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* *501*, 146–150.
47. Bortolus, M., Dalzini, A., Toniolo, C., Hahm, K. S., and Maniero, A. L. (2014). Interaction of hydrophobic and amphipathic antimicrobial peptides with lipid bicelles. *J. Pept. Sci.* *20*, 517–525.
48. Chen, Y., Vasil, A. I., Rehaume, L., Mant, C. T., Burns, J. L., Vasil, M. L., Hancock, R. E. W., and Hodges, R. S. (2006). Comparison of biophysical and biologic properties of α -helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chem. Biol. Drug Des.* *67*, 162–173.
49. Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H. G., and Shai, Y. (2002). The consequence of sequence alteration of an amphipathic α -helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* *277*, 33913–33921.
50. Pokorny, A., Birkbeck, T. H., and Almeida, P. F. F. (2002). Mechanism and kinetics of delta-lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* *41*, 11044–11056.
51. Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1462*, 157–183.
52. Gregory, S. M., Cavenaugh, A., Journigan, V., Pokorny, A., and Almeida, P. F. F. (2008). A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys. J.* *94*, 1667–80.
53. Muñoz, V., and Serrano, L. (1994). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nature* *371*, 399–409.
54. Jean-François, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M. H., and Dufourc, E. J. (2008). Aggregation of cateslytin β -sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry* *47*, 6394–6402.
55. Khandelia, H., Ipsen, J. H., and Mouritsen, O. G. (2008). The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 1528–36.
56. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, 1994, *22*, 4673–4680.
57. Henikoff, S.; Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, *89*: 10915–10919.

EN BUSCA DE UN PÉPTIDO ESTRUCTURADO Y CON CARACTERÍSTICAS DE PÉPTIDO CATIONICO**1. Introducción**

El primer capítulo nos dirigió a la búsqueda de péptidos catiónicos restringidos estructuralmente y de origen natural como estrategia para entender el efecto de los cambios estructurales sobre el mecanismo de acción y el modelo cinético planteado. La imposición de una secuencia con carga entre +2 a +4, estructurada y con una ruta biosintética establecida restringió el espectro de búsqueda. El resultado obtenido muestra que aún con la gran diversidad que tienen los péptidos de origen natural muy pocos cumplen con los parámetros establecidos. Solo un grupo de péptidos fue el seleccionado y el péptido escogido era un péptido hipotético en el momento de su selección, meses más tarde el péptido fue identificado mas no caracterizado en un estudio global de péptido-genómica acoplada a espectroscopía de masas.

El péptido seleccionado fue SRO15-2005 debido a que pertenece a un grupo de péptidos llamados péptido lasso que tienen una estructura claramente restringida y es catiónico a pH fisiológico. Los péptidos lasso son ribosomales, y su biosíntesis inicia con un péptido precursor que posteriormente es madurado y exportado al medio extracelular por un complejo enzimático. Las proteínas responsables de la biosíntesis, maduración y liberación del péptido ya han sido caracterizadas, sin embargo nuevos péptidos desafían constantemente la función y la forma de interacción de estas enzimas. La estructura de los péptidos lasso les confiere una estabilidad extraordinaria en diferentes medios, lo que les permite tener diversas actividades biológicas en disímiles medios. Esta propiedad ha llamado el interés de varios grupos de investigación que los presentan como moléculas emergentes con gran potencial en la biosíntesis de nuevas moléculas con un alto potencial biomédico. Sin embargo, tener tantas actividades (multi-target), combinado con la aparición de nuevos complejos biosintéticos no ha permitido establecer cuál es su función biológica dentro del organismo productor. [1].

El SRO15-2005 es un péptido de 16 aminoácidos con un arreglo de aminoácidos muy similar a péptidos catiónicos con residuos de arginina y triptófano. Los residuos de Arg y Trp se encuentran ampliamente distribuidos en los péptidos antimicrobianos de origen natural, sus funciones han sido investigadas a fondo, pero no es del todo claro lo que aportan a los péptidos antimicrobianos, aparte de su carga positiva y mayor carácter hidrofóbico, respectivamente. Sin embargo algunos estudios en penta-péptidos muestran que el residuo Trp se puede asociar con las cargas positivas de la colina en la bicapa lipídica debido a su sistema de electrones π proveniente del anillo indólico [2]. Los estudios también muestran que el Trp establece puentes de hidrógeno con el agua y los componentes de las bicapas lipídicas cuando reside en la región interfacial [2,5]. Sin embargo, estos

puentes de hidrógeno ya no están disponibles para los residuos de Trp cuando el péptido se inserta en la fase lipídica pero su grupo indol en forma de paleta favorece las interacciones cohesivas que tienen lugar en las cadenas de los grupos acilo. Debido a esto, se ha propuesto que la región interfacial de la bicapa es ideal para dar cabida a la igualmente compleja naturaleza de Trp. Por otro lado, la naturaleza catiónica de Arg tiene un lugar preferente en los péptidos catiónicos antimicrobianos ya que permite una interacción electrostática efectiva con los grupos fosfato. Estas características aunadas con el impedimento estérico que supone ser un péptido lasso señalan al SRO15-2005 en el modelo de estudio ideal para contrastar las preguntas planteadas en el primer capítulo.

El objetivo de este capítulo es mostrar la técnica de purificación, análisis estructural y relevancia evolutiva y fisiológica del péptido lasso SRO15-2005. Un análisis bioinformático para caracterizar el grupo biosintético de SRO15-2005 y su importancia dentro del phylum de *Streptomyces* fue realizado para demostrar la relevancia de este péptido. Los resultados obtenidos muestran que este grupo biosintético ha sido adquirido por varios organismos relacionados filogenéticamente. Lo anterior demuestra que existe una presión evolutiva por tener este grupo dentro del genoma de organismos del phylum de los *Streptomyces*. La metodología de purificación permitió establecer que el péptido obtenido es cíclico y la dinámica molecular ayudó a establecer que los aminoácidos Arg13 y Arg 14 son los responsables de asegurar el C-terminal en el anillo de caprolactama. Mutaciones puntuales en la secuencia acompañados de análisis bioquímicos confirman el resultado anterior y permiten establecer la labilidad del péptido frente a diferentes condiciones.

1.1 Productos naturales

Los productos naturales usados en áreas de salud, se definen como compuestos químicos que tienen actividad específica y provienen de fuentes naturales como microorganismos, plantas y animales. La edad de oro de los productos naturales comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929 y su producción industrial a gran escala en los años 1940. La gran influencia de estos compuestos se ilustra por el hecho que el 60% de los medicamentos aprobados en el mundo son de origen natural.

Los productos naturales tienen una alta diversidad química y estructural que les permite tener una extensa gama de actividades. Esta diversidad surge por modificaciones genéticas en el organismo productor. Los genes nuevos son el producto de mutaciones aleatorias que permiten al organismo adaptarse a diferentes cambios y, a su vez, produce nuevos productos naturales [1]. Desde el punto de vista biosintético se puede concluir que un organismo tiene una biblioteca genética combinatorial que le permite producir una gran variedad de productos naturales [1].

Este proceso de adaptación genética, combinado con la velocidad de crecimiento de bacterias muy superior a humanos provee de una gran variedad de productos naturales con actividad específica. Pero a su vez,

es un inconveniente en la lucha contra agentes biológicos patógenos, porque éstos adquieren resistencia rápidamente a tratamientos médicos convencionales.

Algunas de estas rutas de adaptación han sido determinadas y clasificadas dependiendo de la estrategia adquirida por el patógeno, entre ellas podemos nombrar la inactivación del compuesto por una enzima, reducción en la concentración intracelular por exportación, modificación de la molécula diana para reducir la afinidad con el antibiótico, etc. Estas diversas estrategias hacen necesario el aislamiento y la identificación de nuevos productos naturales que contrarresten estas cepas evolucionadas.

Aislamiento de productos naturales y una breve introducción a la minería genómica

El aislamiento de un producto natural de forma tradicional se basa en el seguimiento de su actividad biológica, o propiedades fisicoquímicas durante las diferentes etapas de purificación. Caminos alternativos de identificación de productos naturales se enfocan en un análisis detallado del genoma para posteriormente utilizar técnicas de purificación tradicionales. Este nuevo enfoque es conocido como minería genómica, el cual utiliza un análisis bioinformático de la secuencia de ADN de un organismo candidato [2,3].

La minería genómica nace al establecer que hay una organización de genes en un grupo que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de algunos productos naturales en procariotas. Estas proteínas tienen motivos secuenciales relacionados con la función, lo que permite establecer mecanismos y funciones de cada una de ellas en la maduración del producto natural. Cuando un producto natural es identificado y los genes que lo producen también lo están, estudios de homología pueden ayudar a detectar genes con similar organización en otros organismos. Al determinar que esta organización está presente en un genoma diferente al genoma inicial, se considera que este organismo puede codificar un producto natural similar al original. Estudios en minería genómica no solo detectan el grupo biosintético, si no que estudian las genes adyacentes e intergénicos que pueden conferir una mayor variabilidad estereoquímica al producto natural.

Por tanto, la metodología general de la minería genómica se puede resumir en: 1. Análisis bioinformático del genoma de interés con el fin de localizar posibles grupos biosintéticos que codifiquen para las proteínas biosintéticas. 2. Asignar funciones putativas a las proteínas codificadas 3. Análisis primario de homología entre proteínas conocidas y las nuevas. 4. Análisis detallado de las direcciones de lectura 5' a 3' o 3' a 5' para detectar todos los posibles dominios de genes flanqueadores o intergénicos. Después de tener la predicción completa del clúster, las condiciones de expresión pueden ser determinadas. Para esto puede ser utilizado el RT-PCR, estudios de expresión de tipo Northern, micro-arreglos o análisis filogenético. Estas dos últimas técnicas buscan encontrar las condiciones óptimas donde el ARN-mensajero este en su máxima concentración. Posterior a esto se puede realizar un análisis filogenético que busca encontrar relaciones evolutivas entre el organismo analizado y el organismo inicial. Desafortunadamente ninguna de estas técnicas asegura encontrar condiciones

óptimas de expresión del probable producto natural, por lo tanto, es necesario hacer diferentes ensayos a diferentes condiciones donde el crecimiento y la producción deben ser evaluados. Esta técnica es conocida como OSMAC (una cepa muchos compuestos) y su objetivo es intentar reproducir los estímulos necesarios para que el organismo produzca el producto natural en condiciones de laboratorio [4].

Cuando la expresión no tiene lugar con los medios y parámetros usados, se dice que las condiciones son silenciosas y es necesario una manipulación genética para activar reguladores o regiones promotoras [5]. Después de la verificación o la activación de la expresión, el camino a seguir es demostrar que el producto natural puede ser aislado por técnicas como FPLC o HPLC, así la estructura del producto natural se puede elucidar completamente o parcialmente. Una aplicación muy exitosa del uso de la minería genómica es el aislamiento de polienos de salinillactama a partir del actinomiceto marino *Salinispora tropica* [6].

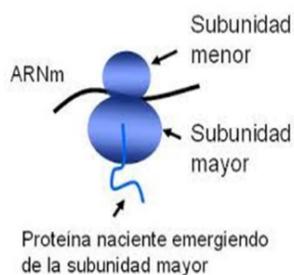
Un enfoque diferente pero igualmente fructífero y enmarcado dentro de la minería genómica identifica inicialmente el sustrato por espectrometría de masas MS y MS². Estos análisis inician identificando la secuencia del producto natural, una vez conocida se traduce a secuencia de ADN. Esta secuencia es comparada con el ADN del organismo productor del producto natural analizado y se identifican los marcos de lectura biosintético. Estos estudios iterativos entre MS y bioinformática enfocados en péptidos son conocidos como péptido genómica y han contribuido en la identificación de diferentes productos naturales. Ejemplos exitosos de este enfoque metodológico es la orfamida, un péptido no ribosomal de *Pseudomonas fluorescens* [6-7].

Péptidos ribosomales y no-ribosomal

Además de los alcaloides, hidratos de carbono, terpenos, policétidos, ácidos grasos y lípidos, los péptidos son un grupo muy grande y farmacológicamente interesante para la investigación. En química los biopolímeros provenientes de la condensación en su gran mayoría de aminoácidos ofrecen una pluralidad química que conducen a una gran diversidad estructural.

La naturaleza tiene dos rutas biosintéticas independientes para generar estos biopolímeros, en una de ellas el esqueleto el polipéptido se sintetiza en el ribosoma con base en una plantilla de ARNm y son los llamados péptidos ribosomales (PR). La segunda ruta produce poli-péptidos por complejos enzimáticos multimodulares que funcionan como el ribosoma pero tienen afinidad por aminoácidos y otras moléculas, conocidos como péptidos no ribosomales (PnR) (**Figura 2.1**). La principal diferencia entre las dos vías biosintéticas es que los RP solamente pueden incorporar los 20 aminoácidos esenciales, mientras RnP pueden ensamblar, además de los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos [8].

Péptidos Naturales



Péptidos Ribosomales

1. Ensamblados en el ribosoma
2. Péptidos constituidos por 20 Aminoácidos
3. Presentan modificaciones Pos-traduccionales y presentan diferentes estructuras.
4. Presente en bacterias y Sistema inmune de organismo superiores

Péptidos No ribosomales

1. Ensamblados por complejos enzimáticos específicos para cada péptido llamados: "*Non ribosomal peptide synthetases*"
2. Estos péptidos muestran una gran diversidad porque además de los Aminoácidos pueden incorporar Carbohidratos, lípidos.
3. Son comúnmente cíclicos pero también existen lineales.
4. Comunes en plantas y hongos.

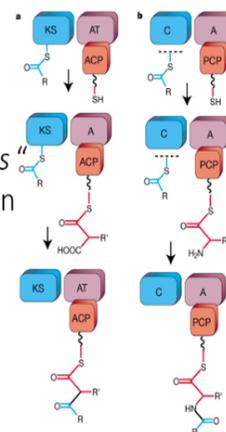


Figura 2.1 Propiedades generales de péptidos Naturales. Péptidos ribosomales y no ribosomales

La inclusión de monómeros como azúcar y ácidos grasos hace una importante contribución a la diversidad estructural de los PnR; por ejemplo, el uso de aminoácidos no proteogénicos confiere una alta estabilidad proteolítica. Se podría considerar que los PR están en desventaja con respecto PnR, sin embargo, esa limitación a 20 aminoácidos proteogénicos es superada con un gran repertorio de modificaciones post-traduccionales.

Algunas modificaciones post-traduccionales de péptidos ribosomales

A pesar de la limitación a 20 aminoácidos para PR, estos han evolucionado análogamente a los PnR y la diversidad estructural es obtenida a través de modificaciones post-traduccionales del esqueleto peptídico. Estas modificaciones se pueden realizar en la cadena lateral o principal del péptido (**Tabla 2.1**). Modificaciones en las cadenas laterales son usuales en Ser, Thr y Cys, en los residuos Ser y Thr predomina la deshidratación obteniendo 2,3-didehidroalanina y (Z) -2,3-didehidrobutirina. Los aminoácidos deshidratados pueden reaccionar entre sí generando enlaces intermoleculares que permiten obtener estructuras heterocíclicas típicas en lactibióticos [9]. Estos heterociclos resultan de un ataque nucleófilo realizado por hidroxilos o tioles que causa la formación de tiazolina, oxazolina o metil-oxazoline compuesto reactivos y capaces de formar enlaces [10].

Tabla 2.1 Información general de las modificaciones post-traduccionales de péptidos ribosomales.

| Modificación | Aminoácidos involucrados | Péptido Natural Ejemplo |
|---|---|---|
| Deshidratación | Ser, Thr | Lantibióticos (Nisina) |
| Lantionina | 2,3 - didehidroalanina , (Z) -2,3- dihidrobutyryna. | Lantibióticos (Nisina) |
| Ciclación | Cys, Ser, Thr | Microcin B17 |
| Prenilación | Trp | ComX |
| Puentes Disulfuro | Cys | Conopéptidos Defensinas Ciclotidos |
| Tioéter Modificaciones en la estructura primaria Proteólisis | Cys | Subtilosin A |
| Anillo de Macrolactama | N-terminal y C-terminal | Circular Bacteriosina, ciclotidos, defensinas tipo theta, péptidos lasso |
| Adición de Nucleótidos | Asp (α -COOH) | Microcin C7 |
| Anillo de tiomacrolactona | Ser, Thr, Cys | Microviridin |
| Glicosilación | Ser | Microcin E27 |

La modificación obtenida en residuos como Cys es la formación de puentes disulfuro, ejemplos de ello son péptidos provenientes de caracoles marinos del género *Conus* [11], Cyclotidos de las plantas [12] y las defensinas antimicrobianas [13]. Una modificación alterna a la cadena lateral de este tipo de residuos es la formación de tioéteres en el carbón alfa; un ejemplo de esta modificación es un péptido circular conocido como subtilosin A de *Bacillus subtilis* [14].

Las modificaciones del esqueleto peptídico es otra estrategia para la diversificación estructural, la modificación más frecuente es la proteólisis, en la que el péptido líder proviene de un péptido precursor el cual ha sido cortado [15]. Macrociclos obtenidos a través del enlace de lactama es otra modificación, la cual consiste

en una deshidratación entre grupos carboxilo y grupos amino. Esta modificación se observa con frecuencia en: bacteriocinas circulares [16], péptidos Lasso [17], defensinas [18].

Péptido ribosomales macrocíclicos

Las estructuras de péptidos macrocíclicos son obtenidas por reacciones de la cadena principal del péptido, o cadenas laterales intramoleculares, obteniendo enlaces como: macrolactama, lactona, tiolactona, tioéter o puentes disulfuro. Los enlaces tipo macrolactama son dados por una reacción de condensación del grupo carboxílico de un aminoácido y un grupo amino de N-terminal o lisina. La **Figura 2.2** muestra cómo con esta simple reacción se contribuye a la diversificación estructural.

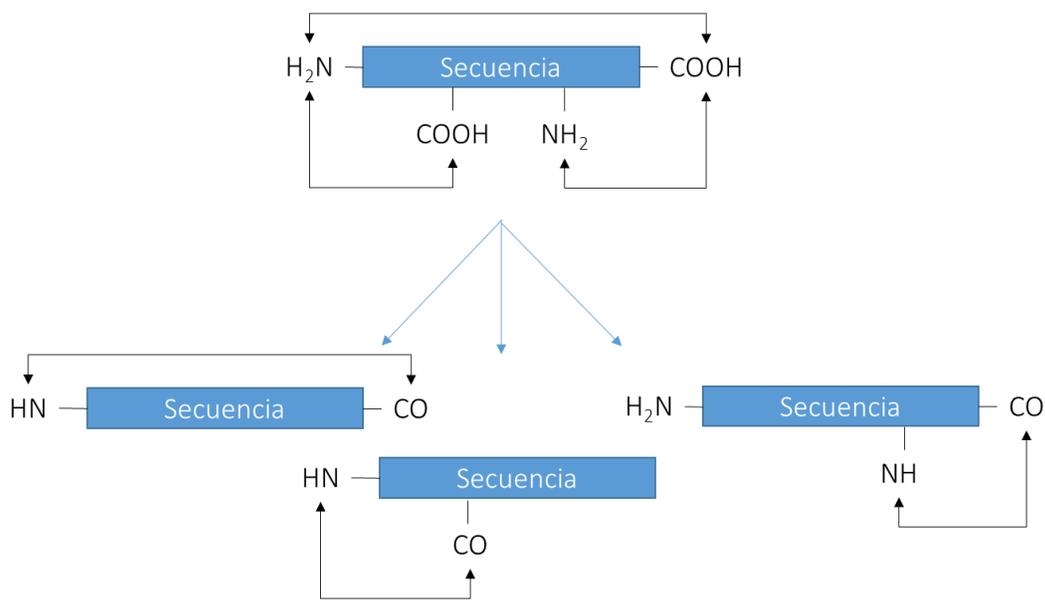


Figura 2.2 Posibilidades de formación del anillo de macrolactama. La condensación puede tener lugar en diferentes posiciones.

Bacteriocinas circulares

Las bacteriocinas se definen como péptidos ribosomales producidos por bacterias que se secretan al espacio extracelular, donde inhiben el crecimiento de organismos competidores. De acuerdo a una nueva clasificación de bacteriocinas por Heng y Tagg las bacteriocinas circulares son agrupadas como clase IV [19]. La clase IV se caracteriza por una ciclación entre el C-terminal y el N-terminal, este enlace reduce la entropía conformacional de los péptidos lineales previamente flexibles, y confiere resistencia a exoproteasas. La biosíntesis de bacteriocinas circulares inicia por escisión proteolítica del péptido líder y una condensación posterior entre el grupo α -amino liberado con el carboxilo del C-terminal forma el anillo de Macrolactama. Un ejemplo especial de las bacteriocinas circulares es la Subtilosin A de *Bacillus subtilis*, ya que es el único representante que tiene otras modificaciones como tres puentes tioéter los cuales son únicos dentro de la clase de péptidos ribosomales (**FIGURA 2.3**). Se demostró que los enlaces son sintetizados por la metionina

adenosiltransferasa usando la S-adenosin metionina (AlbA). La cual es codificada por el operón *sbo-albo* y está contiene dos grupos [4Fe-4S]. Uno de ellos es coordinado por el motivo CXXXCXXC y es el responsable de la incisión de la adenosin-metionina, el segundo grupo biosintético es necesario para la generación de los enlaces de tioéter [20,23]; la biosíntesis se muestra en la **Figura 2.3**.

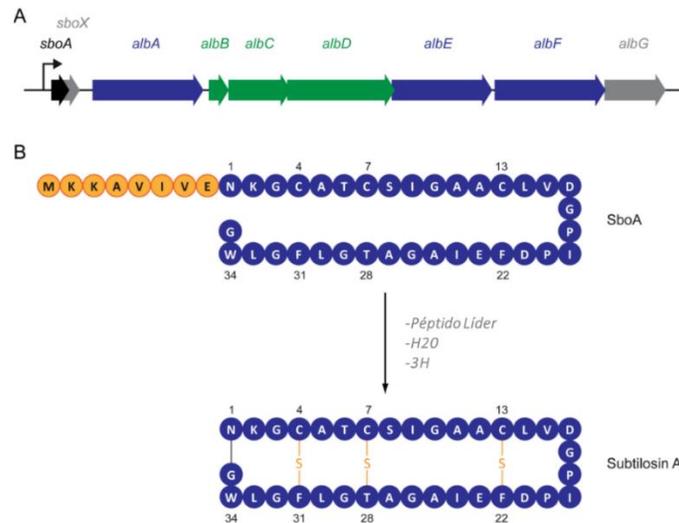


Figura 2.3. Síntesis de la Subtilosin. A. grupos de genes biosintéticos que codifican a la subtilosin A, enzimas de procesamiento están en azul; los genes que confieren auto- inmunidad se muestra en verde. Los genes de función desconocida se destacan en color gris. B. Biosíntesis

Cyanobactinas

Las cyanobactinas son péptidos cíclicos pequeños producidos por diversas cianobacterias que viven en simbiosis con otros organismos en ambientes terrestres, marinos o de agua dulce [24,25]. Los péptidos más estudiados de esta clase son los patelamida A-C [26]. La patelamida A fue aislada de una cianobacteria simbiótica de la *Lissoclinum patella*. El grupo biosintético contiene siete genes *patA*, *patB*, *patC* hasta *patG*, los cuales son necesarios para la biosíntesis, sin embargo *patA*, *patD* y *patG* son los que modifican al gen precursor *patE*. El gen *patE* codifica al péptido precursor, los genes *patD* y *patG* cortan el péptido precursor en el N-terminal y C-terminal; luego *patD* y *patG* ciclan al péptido líder (**Figura 2.4**).

Defensinas

Son péptidos antibacterianos que son la base evolutiva de la inmunidad innata en animales superiores [27]. En los vertebrados, hay tres subfamilias de defensinas; las α - y β -defensinas se describieron por primera vez en 1985 y 1991. Estos péptidos tienen una longitud, entre 29 a 42 aminoácidos, son estabilizados por tres puentes disulfuro y tienen una amplia actividad antibacteriana [28,31]. Las θ -defensinas tienen un tamaño inferior y sobresale la RTD-1 que fue aislada desde leucocitos de monos y es un macrocíclico octapéptido análogo con las α - y β -defensinas por los puentes disulfuro (**Figura 2.5**).

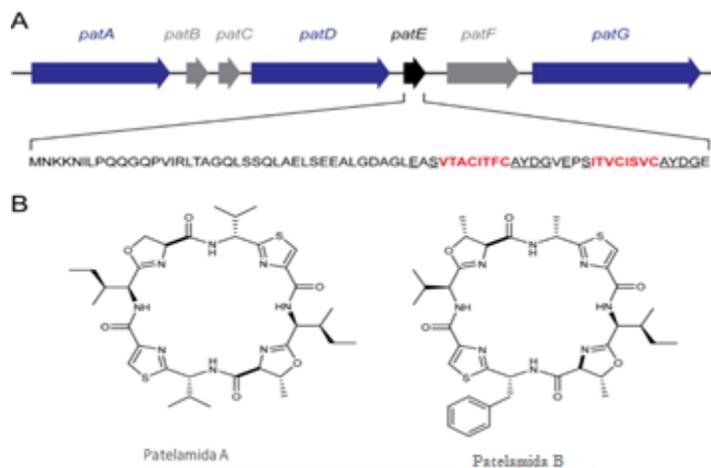


Figura 2.4 Síntesis de la Petelamida A y C. grupos de genes biosintéticos están en azul. Los genes de función desconocida se destacan en color gris. Las secuencia de la patelamida A y C están en letras rojas, las letras subrayadas son los aminoácidos que flanquean y no pertenecen a la secuencia final es decir son eliminados por proteólisis.

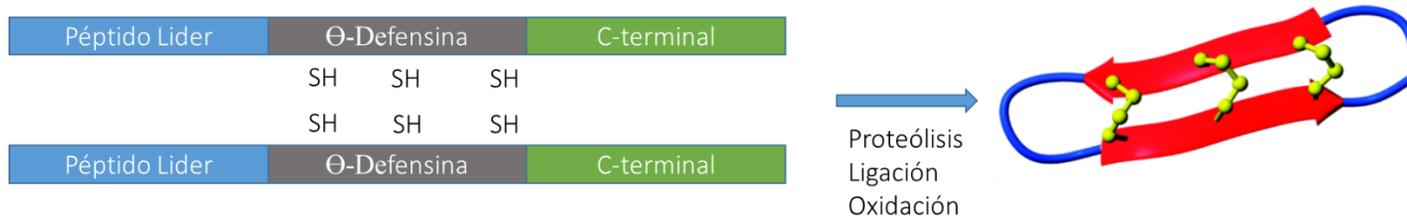


Figura 2.5 Propiedades de las Θ -Defensinas. Caracterizadas por tener hojas paralelas unidas por puentes disulfuro.

1.2 Péptidos lasso

Descubrimiento

La búsqueda de un antagonista para el receptor factor natriurético atrial (ANF) hace 20 años, permitió el aislamiento y caracterización del primer péptido lasso llamado Anantina [32]. Otros péptido lasso como la Propeptina [33], RP 7195 [34], Siamicina I / II [35], RES-701-1 [37 -36], BI-32169 [37], Lariatinas [38] y MccJ2539 fueron descubiertos con una estrategia similar, buscando alguna actividad específica.

Con algunas excepciones como MccJ25 y las Lariatina muchos de estos péptidos lasso nunca se les identificó los grupos de genes que codifican para estos productos naturales. En el caso de la MccJ25 se determinó que su biosíntesis estaba codificada por un plásmido, lo que facilitó la identificación de los genes involucrados. Este análisis sentó las bases genéticas para el estudio de los péptidos lasso y abrió la posibilidad de obtener nuevos péptidos desde diferentes organismos [60]. El primer estudio que usó la homología de los genes McJB and McJC en otros organismos (los primeros pasos de en minería genómica) permitió el aislamiento de la capistraina proveniente de *B. thailandensis* [39].

La minería genómica es una estrategia exitosa en la identificación de péptidos de origen natural, pero en el caso de los péptidos lasso, esta búsqueda está limitada por la falta de similitud de complejo biosintético. Sin embargo, estrategias basadas en la asociación de genes y exploración basada en motivos secuenciales de los genes precursores de la Microcina J25, han permitido encontrar probables péptidos Lasso y superar estas limitaciones. [40,41].

Los péptidos Lasso son productos naturales sintetizados en el ribosoma y tienen una particular fragmentación en MS², lo que permite ser identificados por péptido-genómica [42]. La fragmentación permite obtener una secuencia del péptido líder y el péptido lasso que es comparada contra los marcos de lectura abiertos en el genoma del organismo. La identificación de las enzimas de maduración tiene la misma metodología y son identificadas con una alta confiabilidad debido a varios procesos iterativos entre el patrón de fragmentación y los marcos de lectura de genes. Aunque la péptido-genómica ha proporcionado pruebas concluyentes de la presencia de dos nuevos péptidos de lasso SRO15-2005 y SSV-2083, las estructuras de estos productos aún no han sido resueltas [42].

Características generales

Los péptidos lasso son productos naturales sintetizados en el ribosoma tanto por diferentes tipos de bacterias como ciertas arqueas [39-42]. La principal característica es la estructura tridimensional que adopta, semejante a un nudo o un lasso de vaquero. Esta estructura es alcanzada cuando el C-terminal atraviesa el anillo del macrolactama del N-terminal, resultado de la condensación del amino del N-terminal y el grupo carboxilo del glutámico o aspártico [43,44]. Esta ciclación difiere de la observada en ciclotides o defensinas donde la ciclación ocurre entre los grupos amino y carboxilo del N- y C-terminal.

Estructura y clasificación de los péptidos Lasso

Las características estructurales que comparten todos los péptidos lasso incluyen un N-terminal ciclado compuesto de 7 a 9 aminoácidos, seguidos por un C-terminal lineal [45-55]. El anillo de macrolactama atrapa al C-terminal generando un lazo y una cola (**Figura 2.6**). El anillo del N-terminal está ciclado por la condensación de amino de una glicina o cisteína con el carboxilo de un ácido aspártico o de un ácido glutámico.

Los péptidos lasso enlistados en la **Tabla 2.2** han sido reportados por diferentes técnicas de identificación. Las estructuras reportadas para algunos de estos péptidos de la tabla 2.2 demuestran que el péptido Lasso tiene una inherente quiralidad [56]. El anillo puede atrapar el C-terminal en dirección R o S y análisis con dinámica molecular de la Microcin J25 (MccJ25) demuestra que no hay una diferencia energética entre las dos simetrías [56].

Los péptidos lasso han sido clasificados en diferentes tipos y la diferencia entre ellos radica en la cantidad de puentes de disulfuro que el péptido contenga. La clase I contiene dos puentes disulfuro mientras la clase II no

contiene y la clase tres contiene sólo uno. Los péptidos lasso de clase I y de clase II tienen varios representantes que se han descubierto hasta el momento [42], mientras que el único representante de la clase III es el BI-32169 [37]. La clase I tiene como particularidad que la Cys¹ forma un puente disulfuro y a su vez participa en la formación del anillo.

Los péptidos Lasso clase II no tienen puentes disulfuro y su estructura tipo Lasso es conservada por un impedimento estérico. El péptido más estudiado de esta clase es el Mccj25 [46, 51,52] donde los aminoácidos fenilalanina y tirosina del C-terminal se encuentran en la parte superior e inferior del anillo, lo que no permite que el C-terminal sea liberado (**Figura 2.7A**). El impedimento estérico obtenido es tan eficiente que cuando un residuo anterior a la fenilalanina del C-terminal es cortado el C-terminal permanece atrapado [57] (**Figura 2.7B**). La obvia importancia del impedimento estérico es evaluada mutando diferentes aminoácidos en la secuencia de un péptido Lasso. Por ejemplo en la Capistruina, la Arg 15 es la responsable de mantener el C-terminal fijo, pero cuando esta arginina es sustituida por alanina el péptido Lasso se despliega y su producción disminuye [54].

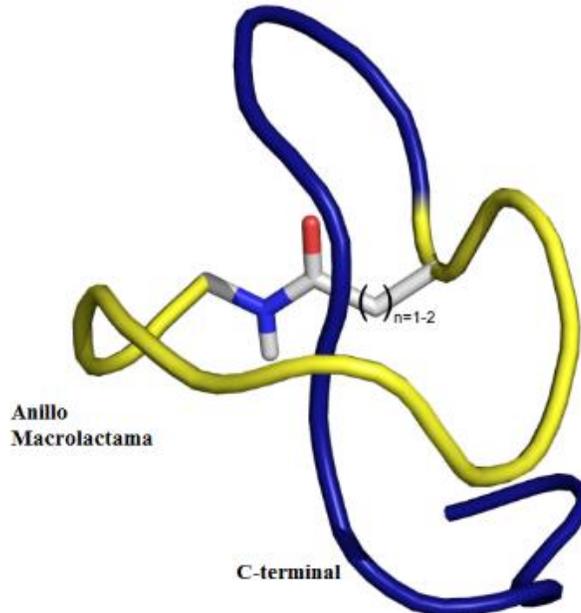


Figura 2.6 Conformación general de un péptido lasso. El C-terminal se encuentra atrapado en el anillo de macrolactama.

La MccJ15 es producida por *E. coli* AY25, la facilidad de crecimiento de esta cepa y los relativos altos niveles de producción, han contribuido para usar a la MccJ25 como modelo de estudio. La maquinaria responsable de la biosíntesis, maduración y exportación de este péptido fue identificada por análisis genómico. El plásmido extraído de *E. coli* AY25 que codifica para la MccJ25 fue aislado y se identificaron cuatro genes responsables de la producción de este péptido lasso (**Figura 2.8**) [58,59].

El gen *mcjA* codifica para el péptido precursor del McJ25 que consta de 58 aminoácidos y es conocido como el péptido precursor McJA. El péptido McJA es escindido en dos partes, el péptido líder conformado por

37 aminoácidos del N-terminal y el resto, que conforman al péptido Lasso. Los genes *mcjB* y *mcjC* codifican para las proteínas McJB y McJC que son necesarias para la maduración del McJA en MccJ25 y un gen *McJD* que codifica para un exportador de tipo ABC [60,61].

Tabla 2.2. Péptidos Lasso reportados hasta el momento.

| | Péptido | Secuencia | Organismo productor |
|-----------------|----------------|-----------------------|--|
| Clase I | RP 71955 | CLGIGSCNDFAGCGYAVVCFW | <i>Streptomyces sp.</i> [37] |
| | Siamycin I | CLGVGSCNDFAGCGYAIVCFW | <i>Streptomyces sp.</i> [95] |
| | Siamycin II | CLGIGSCNDFAGCGYAIVCFW | <i>Streptomyces sp.</i> [95] |
| Clase II | Anantín | GFIGWGNDIFGHYSGDF | <i>Streptomyces coeruleus</i> [83] |
| | Capistrúin | GTPGFQTPDARVISRFGFN | <i>Burkholderia thailandensis</i> [39] |
| | Lariantín A | GSQLVYREWVGHSNVIKP | <i>Rhodococcus sp. K01-B0171</i> [38] |
| | Lariantín B | GSQLVYREWVGHSNVIKPGP | <i>Rhodococcus sp. K01-B0171</i> [38] |
| | Microcín J25 | GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG | <i>E. coli AY25</i> [58] |
| | Propeptín | GYPWWDYRDLEGGHTFISP | <i>Microbispora sp. SNA-115</i> [35] |
| | RES-701 | GNWHGTAPDWWFNYYW | <i>Streptomyces sp. RE-701</i> [36] |
| | SRO15-2005 | GYFVGSYKEYWSRRII | <i>Streptomyces roseosporus</i> [42] |
| | BI-32169 | GLPWGCPSDIPGWNTPWAC | <i>Streptomyces sp</i> [37] |

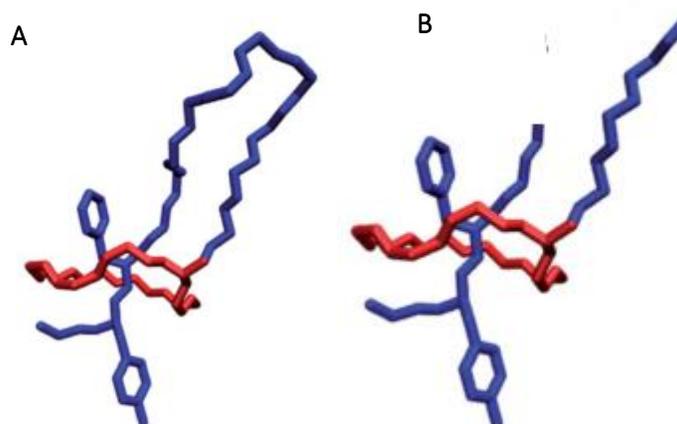


Figura 2.7. Estructura de la Microcín J25. **A.** Se observa que el impedimento estérico es obtenido a través de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. **B.** Se mantiene el C-terminal aun cuando parte del C-terminal ha sido separado por una péptidasa.

Biosíntesis de péptidos Lasso

Análisis bioinformáticos han predicho que el gen *mcJD* que codifica para McjD es un transportador tipo ABC dependiente de ATP, el cual transporta el MccJ25 de espacio intracelular al espacio extracelular. Se cree que la proteína McJD evita grandes concentraciones de péptido en el medio intracelular confiriendo inmunidad a la célula por un flujo activo del péptido. Análisis estructural *in silico* de McJD predicen que contiene seis hélices transmembranales y un C-terminal citoplasmático [62,63], el cual se considera necesario para el reconocimiento y liberación de la MccJ25. Datos experimentales reportan que la proteína Yojl que contiene un C-terminal citoplasmático muy similar a McJD también puede difundir el MccJ25, corroborando la importancia del C-terminal en McJD [64].

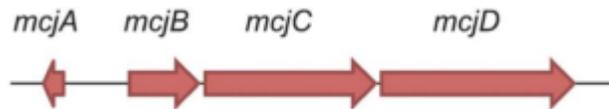


Figura 2.8 Genes precursoros de la biosíntesis del péptido Lasso MccJ25. El *mcjA* codifica para el péptido líder, *mcjB* es la peptidasa, *mcjC* es la asparagino sintetasa y *mcjD* es el transportador ATP.

La estructura de McJB y McjC no ha sido obtenida aún, pero estudios de homología han ayudado a establecer su función y participación en la biosíntesis de estos péptidos. McjB tiene un 30 a 45% de similaridad con las transglutinasas, cuya función principal es estabilizar los enlaces covalentes entre proteínas. Una análisis más detallado encontró que la triada de residuos (Cys-His-Asp), está evolutivamente conectada con proteasas, lo que que explica la capacidad de hidrolizar el enlace peptídico [65]. La proteína McjC es similar a la proteína asparagino sintetasa dependiente de ATP y Mg^{2+} y con un motivo estructural llamado AS-B que coordina estos dos cofactores. Por lo tanto, se ha propuesto que el McJC participa en la activación del grupo carboxilo del ácido glutámico o aspártico para la formación del anillo [61,63].

Ensayos de complementación y activación de genes *in vivo* e *in vitro* muestran que *mcJB* y *mcJC* son necesarios para la producción de la microcina MccJ25 [59,61]. Un ensayo que soporta este argumento es la incubación de McJA con McjB y una forma inactiva de la McjC [D302A] (mutación en la dominio AS-B) donde se obtuvo la acumulación de MccJ25 lineal; lo que confirma que McJC participa en la formación del anillo y estructura. En ausencia de McJB, pero con McJC y MccJ25 lineal no se obtuvo el péptido Lasso MccJ25, esto revela que estas dos enzimas son interdependientes. La dependencia con ATP fue evaluada cambiando este sustrato por análogos no hidrolizables en presencia de McJA, McJB y McjC y como resultado no se obtuvo MccJ25, lo que indica que el ATP tiene un rol clave en la biosíntesis.

La interdependencia de McJB y McJC ha dado lugar a una teoría que incluye la formación de un complejo con un dominio citoplasmático constituido de McJB-McJC y otro membranal constituido por McJD. Este

complejo tendría algunas ventajas fisicoquímicas y termodinámicas como la reducción de energía libre y la disminución de un compuesto citotóxico en el citoplasma [63,66]. Como se mencionó anteriormente, el péptido precursor McJA codificado por el gen *mcJA* está compuesto por un péptido líder y el MccJA lineal y son separados por la enzima McJB. La importancia del péptido líder fue mostrada cuando se incubó el MccJ25 lineal con McJB y McJC, obteniendo una baja concentración de MccJ25 en comparación al detectado cuando se usa toda la secuencia. Estudios *in vivo* han eliminado secuencialmente los residuos que conforman el péptido líder hasta llegar a la forma lineal del MccJ25 y han evaluado la producción de MccJ25. El resultado obtenido es que ocho residuos antes del aminoácido responsable de la ciclación (Gly o Ser) son estrictamente necesarios para la obtención de la MccJ25. Ensayos similares en capistruina demuestran que son necesarios al menos 13aa de los 27 aminoácidos del péptido líder para mantener el rendimiento de la capistruina.

Una propiedad que ha revelado los estudios por homología y mutaciones aleatorias de diferentes péptidos líderes es que la treonina en la penúltima posición con respecto al aminoácido responsable de la ciclación es muy conservada. La importancia de este residuo se ha demostrado tanto para la MccJ25 como para la capistruina, ensayos demuestran que cambios en esta posición son críticos en la producción del péptido [67]. Por ende la treonina es señalada como residuo catalítico y que también funge como sitio de reconocimiento entre el complejo biosintético y el péptido McJA [68]. Por el contrario mutaciones puntuales del C-terminal en el McJA no afectan directamente la producción, excepto para los residuos que participan en la estabilización y aseguramiento del C-terminal.

Purificación de péptidos Lasso

Los péptidos Lasso han sido aislados desde los medios de cultivo de los organismos productores en diferente fase de crecimiento o por expresión heteróloga en *E.coli*. Debido a que la mayoría de péptidos Lasso son exportados del medio intracelular al extracelular, la purificación inicia con una centrifugación del medio para obtener un sobrenadante libre de células [55,69,70]. La cantidad de péptido obtenida depende de las condiciones de crecimiento del organismo productor, las condiciones de expresión (*E.coli*) y las características fisicoquímicas y citotóxicas del péptido. Algunos péptidos como el MccJ25 y Anantina alcanzan su mayor concentración en el sobrenadante después de la fermentación, por el contrario para otros su concentración es muy precaria en cualquier etapa de crecimiento [54]. En algunos casos cuando la expresión es muy poca y la heteróloga es inviable, se han tenido que hacer fermentaciones a escala industrial para poder obtener las suficientes cantidades para análisis posteriores [55,69,70].

El MccJ25 es producido bajo condiciones de depleción de nutrientes [71], caso contrario ocurre con la capistruina que es detectable en las primeras etapas de la fase exponencial [54]. En ambos casos el rendimiento no fue el deseado, y por ende se usó la ingeniería genética y una selección de óptimas condiciones de expresión

para mejorar el rendimiento. La expresión heteróloga de la capistraina y la MccJ25 permitió el uso de medios líquidos mínimos de crecimiento, lo que disminuyó la complejidad del sobrenadante en las primeras etapas de purificación. La hidrofobicidad de estos péptidos permite que se realicen extracciones por partición o en fase sólida, estas dos técnicas reducen el volumen inicial y disminuyen la complejidad de la matriz. Después de estas técnicas iniciales la cromatografía de altas presiones (HPLC) es requerida en varias escalas analítica y preparativa para purificar el péptido.

Debido a que en muchos casos no se conocen la actividad de estos péptidos es necesario usar a la masa como criterio de búsqueda y poder valorar la metodología de purificación. El patrón de fragmentación en MS² ofrece una valiosa información estructural del péptido analizado. Para péptidos lineales la fragmentación está bien establecida y difiere de los péptidos cíclicos. Por esto, el MS² provee la información preliminar acerca de la localización del anillo en el péptido lasso debido a que la fragmentación canónica solo ocurre en el C-terminal. Por lo tanto, es común encontrar en los espectros de MS² para péptidos lasso una ausencia de fragmentación una vez que el anillo sea formado **Figura 2.9** [72].

Más información sobre la topología del péptido lasso se puede extraer de los estudios de espectrometría de masas pero se necesitan equipos y técnicas más sofisticados. Por ejemplo, diferenciar entre el péptido Lasso y el topoisómero (sin el C-terminal atrapado en el anillo) necesita dos iones de escisión generados del C-terminal por encima de los aminoácidos involucrados en el impedimento estérico. Estos productos se observan fácilmente para MccJ25 cuando es inducido por colisión (CID y ECD), pero no se observan para capistraina ya que tiene un C-terminal mucho más corto [73]. Para este péptido, la estructura de lasso se asignó mediante la comparación de su patrón de fragmentación de ECD y el topoisómero, que se diferencian por productos los generados y abundancia de los radicales próximos al anillo [73].

La resonancia magnética nuclear RMN establece la estructura terciaria del péptido y por tanto el C-terminal se encuentra embebido en el anillo [46, 74]. El B1-32169 es el único péptido lasso con estructura obtenida a través de rayos x el resto proviene de resonancia magnética homonuclear y heteronuclear de alta resolución [45]. La estructura tridimensional es relevante ya que revela que disposición estructural es evolutivamente relevante para mantener el plegamiento y la densidad de carga del péptido que se relaciona con su capacidad de interacción.

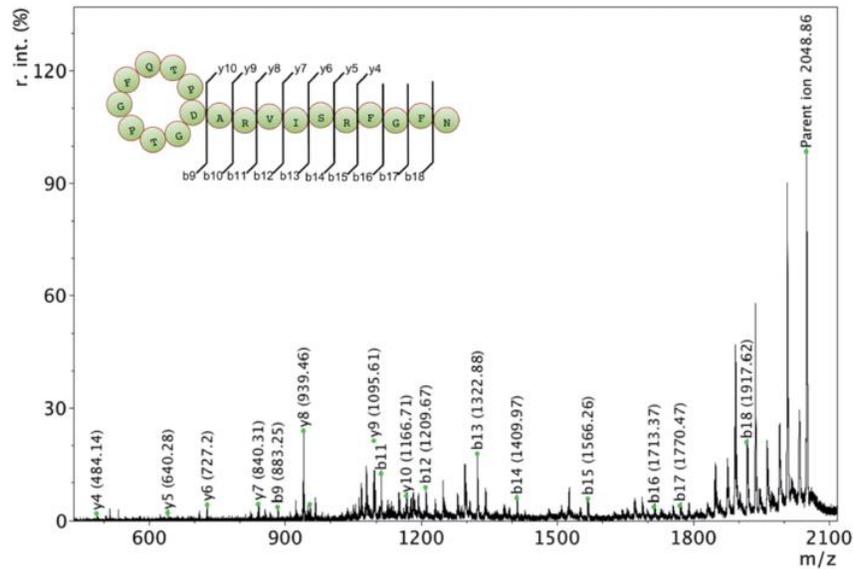


Figura 2.9 Ejemplo de un espectro de masas para un péptido Lasso capistruina. El péptido es fragmentado, obteniendo las series *b* y *y* correspondientes. Observe que fragmentaciones en el anillo no se observan.

Biología Molecular en péptidos Lasso

Los genes que codifican a la capistruina fueron clonados y transformados en *E. coli* bajo un promotor T7 con un rendimiento de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ que es el 30% del obtenido desde la *B. thailandensis* [54]. Posteriormente, se encontró que la región intergénica entre CapA y CapB incluye una secuencia invertida que funciona como regulador de expresión en *B. thailandensis*. Al cambiar esta región por un RBS optimizado el rendimiento aumentó a 10 mgL^{-1} . La inserción de un RBS optimizado para *E.coli* en la región intergénica entre homólogos de A y B es un procedimiento que ha mejorado el rendimiento de algunos péptidos provenientes de proteobacterias. La biología molecular realizada en péptidos Lasso provenientes de *Streptomicestos* es muy poca, debido a la alta complejidad a la manipulación de su ADN. Algunos estudios en Lariantina de la *R. Jostti* se han realizado con el objetivo de identificar los genes que codifican este, sin involucrar sobreexpresión en otro huésped.

Sustituciones de todos los 21 aminoácidos que componen el MccJ25 excepto la Gly1 y el carboxilo del Glu8 ya que forman el enlace amida para el cierre del anillo fueron realizadas [76]. Los resultados mostraron por primera vez que el complejo enzimático acepta una variabilidad alta en el péptido líder [76]. Estudios complementarios en la evaluación de la permisividad de la secuencia del péptido lasso fue evaluada usando un algoritmo computacional que evalúa y clasifica variantes con tres sustituciones del MccJ25 con base en la energía y plegamiento [78,79]. Tras la evaluación, ocho variantes fueron seleccionadas, construidas y probadas *in vivo*; seis de las ocho variantes fueron obtenidas, y cinco se produjeron en cantidades comparables a MccJ25 nativo

[78]. Esta capacidad de los péptidos lasso para aceptar mutaciones sin perder estabilidad es una característica que los puede convertir en andamios estructurales y secuenciales.

La MccJ25 fue usada como andamio estructural (ubicando moléculas de carácter antimicrobiano en su secuencia) y se obtuvieron alrededor de 100 nuevas variantes, de las cuales la mitad tiene una actividad antimicrobiana mayor a la MccJ25 original [84]. Una importante observación de este estudio fue que algunas de las mutaciones no eran permisibles como mutaciones puntuales pero son permisibles en variantes con sustituciones múltiples. En conjunto, estos resultados demuestran que la secuencia del péptido lasso es un espacio que puede soportar muchas variaciones, convirtiéndolo en un excelente candidato al desarrollo de epítopos bioactivos.

Actividades biológicas

Los péptidos lasso tienen un amplio espectro de actividades que les permite ser multi-objetivo, por ejemplo la RP 71955 y las siamycina I y II [80,81] y RP 71955 inhiben la aspartil proteasa y transcriptasa del VIH-1. En investigaciones posteriores se encontró que actúan como antimicrobianos a escala micromolar contra bacterias Gram negativas y Gram Gram-positivas, incluyendo *B. subtilis*, *S. aureus* y *Streptomyces viridochromogenes* [82]. Siamycins I y II son igualmente activos contra *B. subtilis* y *S. aureus*, y *Micrococcus luteus*, y en Gram-negativas como *E. coli*, estos péptidos también poseen actividad contra VIH [31,81]. La Anantin aislada de *Streptomyces coeruleus* un probable péptido Lasso es capaz de antagonizar a receptores del factor natriurético y al mismo tiempo carece de actividad antimicrobiana o antifúngica [83]. RES-701-1 es un antagonista selectivo del receptor endotelina tipo B con afinidad en el rango nanomolar, el BI-32169 de clase III muestra una fuerte actividad inhibitoria contra el receptor de glucagón [84, 70 ,85].

La actividad antimicrobiana de estos péptidos Lasso se restringe generalmente a cepas estrechamente relacionadas filogenéticamente o con bacterias que vivan en su entorno natural. El MccJ25 por ejemplo es activo contra varias especies bacterianas Gram-negativas incluyendo *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, y [58]. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de MccJ25 varía de nano- a micromolar, dependiendo del medio y la técnica utilizada [39 -58]. Sin embargo, la MccJ25 no tiene actividad frente a Gram-positivas como *B. subtilis* y *L. acidophilus*, así como, la levadura *S. cerevisiae* [58].

El mecanismo antimicrobiano de la MccJ25 inicia con la interacción específica entre el receptor transportador de hierro FhuA y la región beta del C-terminal actuando como epítipo frente a FhuA [44-47]. Después de entrar en el citosol se incorpora la subunidad beta de la ARN polimerasa (ARNp) inhibiéndola y por ende promoviendo la muerte celular [49 -86].

Un modelo adicional de MccJ25 fue sugerido en el cual la interacción de este altera el potencial de membrana, lo induce una producción de superóxido y a la disipación de la membrana [87-89]. Muchas cepas

reproducen este comportamiento por interacción con el MccJ25, sin embargo datos con este mismo enfoque demuestran que en *E.coli* no presenta variación de potencial. La explicación a este comportamiento se basó en la identificación de un transportador (FhuA) el cual permitió un flujo de MccJ25 [87-88]. Otras pruebas sugieren que el MccJ25 es capaz de interrumpir los eventos en la cadena respiratoria bacteriana y tienen un efecto bacteriostático de larga duración [89].

La capistruina tiene una modesta actividad antimicrobiana frente a *B. caledonica*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, y trabajos recientes muestran que este péptido actúa mediante la inhibición de la transcriptasa [55,90]. La falta de similitud de secuencia entre MccJ25 y Capistruina pero con el mismo target, indica que la topología Lasso es la responsable de la capacidad de estos péptidos para inhibir la ARNp.

Por último, la lariatina A y B producidas por *R. jostii* también tienen actividad contra micobacterias incluyendo el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, aunque ningún estudio se han llevado para entender su mecanismo de acción [91].

Estudios genómicos para obtención de péptidos Lasso

En 2008, con el descubrimiento de la capistruina la era de la minería genómica para péptidos lasso se inició. Anterior a esto, todos los péptidos lasso fueron purificados desde medios de cultivo del huésped nativo [53]. Actualmente, 21 de los 32 péptidos Lasso conocidos fueron identificados usando la minería genómica. Tres enfoques distintos han tenido éxito para identificar péptidos lasso: 1. consulta de proteínas homólogas a las enzimas de maduración; 2. Búsqueda basada en la propiedades bioquímicas del péptido precursor de la McccJ25; 3. Minería genómica guiada por espectroscopia de masas.

Homología y minería genómica

Los primeros pasos hacia la búsqueda de péptidos Lasso desconocidos fue usar McjB y McjC las únicas enzimas de maduración conocidas en ese momento como plantilla de las búsqueda en otros genomas. A pesar de la poca homología de McjB y McjC a otras enzimas en la base de Datos global de proteínas, los resultados de esta búsqueda sugirieron enzimas de maduración homólogas que estaban presentes en otros genomas bacterianos [92,36]. Este análisis determinó que los marcos de lectura abiertos podrían codificar péptidos precursores en las proximidades de las enzimas de maduración. Se reafirmó que la glicina se conserva en la primera posición del péptido líder y las longitudes de éste mostraron ser consistentes a pesar del bajo grado de conservación de secuencia entre ellos [92,36].

La predicción de la secuencia de la capistruina de *B. thailandensis*, y su posterior producción endógena y heteróloga en *E. coli* fue la primera aplicación exitosa de la minería genómica [53]. Los autores buscaron a MccjB y posterior a eso buscaron manualmente el péptido en un marco de lectura abierta (ORF) contiguo a esta

proteína. A su vez se encontraron los homólogos de McjC y McjD, completando así el grupo de genes *capABCD* [53]. Este camino de predicción es muy complicado debido a que los péptidos precursores tienen corta longitud y eluden la predicción de algoritmos que son habitualmente aplicados a los nuevos genomas secuenciados [6 93]. Sin embargo, este tipo de estudios determinó que la Capistruina es quizás el péptido Lasso más ampliamente distribuido ya que su grupo biosintético se puede encontrar en una serie de cepas de *Burkholderia* como de *B. thailandensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. oklahomensis* [57].

La estrategia de utilizar una proteasa cisteína McjB como templado de búsqueda de nuevos grupos biosintéticos, permitió el descubrimiento de la caulosegina I, II, III en el genoma de *Caulobacter segnis*. Después de confirmar la presencia de los péptidos precursores y una proteína McjC- homóloga, la producción de caulosegna I y II se verificó por espectrometría de masas. Sorprendentemente el gen que codifica para el transportador ABC dependiente de ATP no fue encontrado, aunque se detectó la producción de péptidos en las células y sobrenadantes de *C. segnis*.

Minería genómica con base en el precursor

La minería genómica ha planteado varias estrategias para la identificación de nuevos PR, la gran mayoría busca enzimas homologas de maduración en una arquitectura preestablecida [94].

Un enfoque alternativo consta de dos pasos, primero un estudio de marcos de lectura cortos (precursor) y luego marcos de lectura abiertos para examinar el vecindario genético e identificar las enzimas de maduración probables. La aplicación de este método encontró 79 grupos de genes putativos de más de 3.000 genomas conocidos en el momento del estudio que abarcó el phylum bacteria y el phylum arquea [57]. Uno de estos péptidos Lasso predichos fue el Astexin de *Asticcacaulis excentricus* el cual se expresó de forma heteróloga y endógena y su estructura fue resuelta por RMN.

La importancia de este método no sólo radica en ser capaz de identificar de manera eficiente los genes precursores, sino también en la capacidad de diferenciación de falsos positivos. Esto se logró porque el modelo de búsqueda está basado en las características bioquímicas del péptido precursor y no en motivos que son hipervariables para los péptidos lasso. Una ventaja del enfoque centrado en el precursor es que está altamente automatizado y no se basa en la anotación de genes.

Minería genómica guiada por espectrometría de masas

El método de péptido-genómica utiliza los espectros de MS de extractos microbianos obtenidos de colonias, e identifica los productos de interés luego se analizan por MS² para determinar las secuencias. Estas secuencias se comparan contra: 1. Posibles traducciones de marcos de lectura del genoma del organismo analizado 2. Secuencias de sustratos ya conocidas, lo que permite identificar el tipo de productos naturales. Entre los

péptidos Lasso identificados se encuentran uno de clase I (SSV-2083) y la otra clase II (SRO15-2005). La secuencia de SSV-2083 es significativamente diferente a los péptidos de esta clase especialmente en el anillo, el SRO15-2005 es un péptido Lasso extraordinariamente corto con tan solo 15 residuos. El SRO15-2005 se aisló de extractos de n-butanol de esporulación *Streptomyces roseosporus*, mientras SSV-2083 se detectó por esporulación de *S. sviveus* con una técnica de MALDI-Imaging.

Contribuciones de la minería genómica

La minería genómica ha permitido establecer que los péptidos Lasso están ampliamente distribuidos en Bacterias, la clase I y clase III pertenecen a las *Actinobacteria*, mientras la clase II a *Proteobacterias* [57]. En contraste con otras clases de productos naturales la biosíntesis de péptidos lasso necesita un grupo pequeño de genes, lo sorprendente es que la disposición de estos en el genoma varía sustancialmente. La existencia de arquitecturas diferentes es una revelación que surge a partir de estudios de minería genómica (**Figura 2.9**) Antes del descubrimiento de Astexina-1, todos las arquitecturas eran ABC y un transportador D asociado [57]. La supuesta necesidad del gen transportador que confiere inmunidad al péptido lasso quedo en entre dicho cuando se descubrió que la Astenxin no tenía un gen D. Sin embargo el análisis de genes adyacentes al ABC-Astexin encontró un gen E que codifica para una isopeptidasa capaz de linearizar el péptido lasso, lo que se considera una nueva estrategia de protección alterna al exportador tipo ABC [84] (**Figura 2.9**).

La isopeptidasa es homóloga a la familia de prototeasas prolil-oligopeptidasas, que ha sido asociada a la biosíntesis de otros productos naturales como amatoxinas [56] y la flavipeptina [96]. Esta enzima llamada AtxE1 se purificó y se midieron sus parámetros cinéticos determinando que: 1. Hidroliza específicamente el enlace amida entre Gly1 y Asp8, dejando un péptido lineal. 2. El reconocimiento de las Astexinas por AtxE2 parece estar basado en la estructura, ya que no puede hidrolizar al topoisómero de la Astenxina [84].

Estas observaciones han desafiado la premisa que la actividad principal de péptidos Lasso es ser antimicrobianos, de hecho, los péptidos de Lasso que contienen isopeptidasa son antimicrobianos muy débiles. Este comportamiento posiblemente es la primera evidencia de diversificación funcional de los péptidos lasso, grupos biosintéticos con un gen transportador son péptidos antimicrobianos mientras los que no lo tienen cumplen otra función. Un análisis bioinformático reveló varias arquitecturas y destaca que los grupos con isopeptidasa comparten una arquitectura constante donde la isopetidasa está rodeada por el transportador TonB-dependiente y un regulador sigma (**Figura 2.9B**) [45, 84].

A).

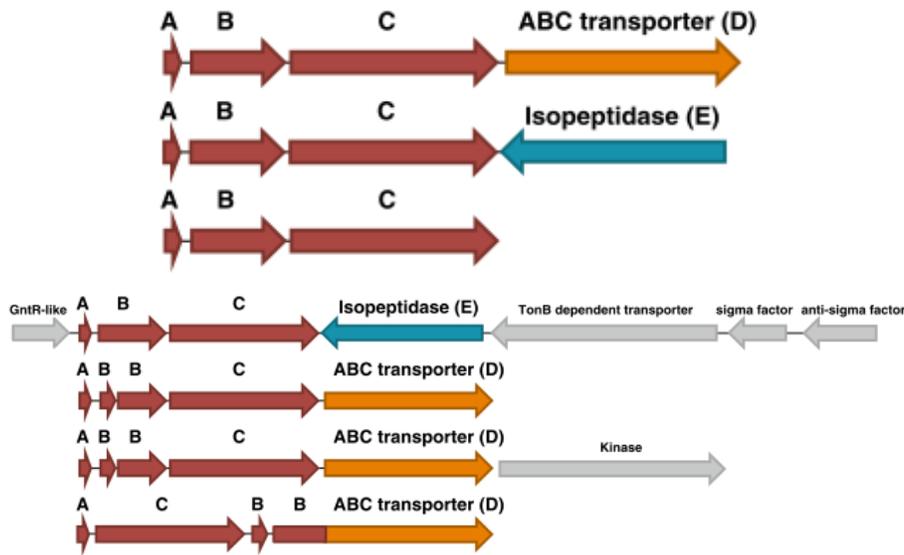


Figura. 2.9 Tipos diferentes de organización de genes en la biosíntesis de péptidos Lasso. A). Tres organizaciones características en los péptido Lasso. **B)** Algunas características de genes adyacentes al grupo biosintético.

2. Planteamiento del problema

Los péptidos Lasso tienen una conformación topológica estable única, constituyen una clase de péptidos fascinantes que tiene una serie de características que los catapultan a convertirse en moléculas de alto valor biomédico. Sin embargo, sus características y rutas biosintéticas no son del todo entendidas y muchas investigaciones se enfocan en explorar la biosíntesis, purificación y aplicabilidad de las características intrínsecas de los péptidos lasso. Nuestro problema se encuentra enmarcado hacia otra dirección y es la necesidad de encontrar un péptido con características catiónicas y con una estructura rígida, para validar el modelo cinético planteado. Sin embargo, en el camino de purificar y caracterizar un péptido lasso con las características mencionadas anteriormente, se intenta ampliar el conocimiento acerca de estos péptidos y de la técnica bioinformática usada.

3. Diseño Experimental

1. Búsqueda de péptido de origen natural con características de péptido catiónico y con impedimento estérico. Para esto buscamos en las bases de datos de péptidos ribosomales ya reportados y los comparamos con las características reportadas para péptidos catiónicos.

2. Caracterización molecular de los genes que involucran la biosíntesis del péptido lasso seleccionado. Planteamos una metodología basada en la minería genómica que nos permitió caracterizar a nivel genómico que

grupo de genes son los que participan en la biosíntesis del péptido escogido. Análisis complementarios como estudios filogenéticos y caracterización del grupo de biosíntesis, permiten establecer la relevancia de este péptido dentro del phylum seleccionado.

3. Obtención del péptido seleccionado. Dos rutas de obtención son establecidas, la primera usa como fuente inicial la expresión endógena del organismo productor del péptido, para lo cual fue necesario caracterizar en qué fase de crecimiento y en qué cantidades se expresa el péptido. La segunda ruta utiliza como fuente la expresión heteróloga del péptido en un plásmido en *E. coli*, optimizando sus condiciones de expresión.

4. Purificación y caracterización estructural del péptido seleccionado. A partir de técnicas cromatográficas a baja y alta presión se establece una metodología de purificación que es evaluada a través de espectrometría de masas (MALDI-TOFF, MS, MS²). La caracterización estructural es realizada por métodos bioquímicos como tratamientos térmicos, degradación enzimática, mutaciones puntuales y patrones de fragmentación en MS². Si los rendimientos de obtención son altos es posible utilizar técnicas como RMN, sin embargo la caracterización por MS² y pruebas bioquímicas permite establecer la estructura los niveles requeridos en este trabajo.

4. Resultados

4.1 Minería genómica centrada en genes homólogos de B

El análisis de 140 especies de Actinobacterias, permitió la identificación de 61 grupo putativos que codifican para un posible un péptido lasso, de los cuales, 12 ya fueron reportados y confirmados [97,98,99,100,101]. Las características generales de estos grupos putativos son: 1). 43 de los péptidos precursores encontrados tiene el motivo canónico X₅₋₄₃TXGX₅₋₇ (E / D) X₅₋₁₆ de tipo clase II, de estos 9 péptidos ya han sido reportados y purificados [98, 102]. 2). 18 grupos biosintéticos codifican para péptidos lasso no canónicos, los cuales no serán analizados porque aunque es posible su existencia, sus características han sido pobremente documentadas. 3). Por último encontramos dos grupos que codificaban para péptidos de clase III (Apéndice S1).

Un análisis detallado de los 43 grupos que codifican péptidos lasso canónicos muestra que la mayoría de ellos tienen los genes A-, B-, C-, D- y solo 11 de ellos presentan ausencia del gen D. Sorprendentemente en 31 de los 43 grupos, el gen B se divide en dos genes; por homología el gen B1 es similar a pirroloquinolina-quininona y el segundo a las transglutaminasas B2 [29 -99].

Las relaciones evolutivas entre los 43 grupos se establecieron a través de la construcción de un árbol filogenético concatenado de los genes A, B1, B2, C, y D [103,104] (**Figura 2.10**). Este árbol se dividió en cuatro grupos, que tienen las siguientes características:

1. **Clado I**; Está compuesto por clústeres que contienen los genes *A*-, *B1*, *B2*, *C*, *D*. La secuencia del péptido Lasso producido en todos ellos es muy similar, excepto para el *Rhodochrous jostii* y *Rhodococcus*. La presencia *Rhodococcus jostii* en este clado es importante ya que este produce un péptido lasso que ya ha sido purificado y caracterizado, lo que valida el método de análisis bioinformático utilizado (**Figura 2.10**).
2. **Clado II**; Contiene una mezcla de arreglo de genes del tipo *A-C-B2*; *A,C,B1,B2-D*; *A,C, B1, B2*.
3. **Clado III** tiene una mezcla de arreglos *A,C,B,D* y *A,C,B1,B2,D*.
4. **Clado IV** no contiene ni el gen *D* ni el gen *B1* PqqD (Figura 2.10).

Adicionalmente, se comparó el árbol de grupos biosintéticos con los árboles de proteínas individuales (*A*, *B2*, y *C*); encontramos que, independientemente del gen analizado, estos árboles agrupan los mismos organismos del clado I (**Figura S1, S2 y S3**). El alineamiento del péptido precursor conservado en el clado I evidencia que sólo existen tres posiciones donde se permite un cambio de aminoácido. En la **Figura 2.11** observamos que en la cuarta posición acepta aminoácidos como Val o Tyr, en la posición 12 Ser, Thr o Val, y por último en la posición 16 una Ile, Val o Ser.

Un análisis complementario, el cual busca secuencias homólogas entre las proteínas putativas de cada clado fue realizado para caracterizar y encontrar posibles relaciones filogenéticas no establecidas anteriormente. Los resultados muestran que los motivos conservados en la proteína B incluye una tríada característica de las transglutaminasas [105] (**Figura S4**). Para las proteínas C, existen tres motivos conservados dos de los cuales ya han sido reportados [98] y se consideran homólogos a las asparagino sintetasas. El tercer motivo está presente únicamente en los homólogos C del clado I. Esta es una evidencia de la necesidad de un motivo específico en el complejo enzimático para un péptido precursor específico (**Figura S5**).

4.2 Expresión endógena del péptido SRO15-2005

La mayoría de los péptidos Lasso provenientes de Actinobacterias son obtenidos desde su expresión endógena y están estrechamente relacionados con la fase de crecimiento en que se encuentra. Debido a la escasa información acerca de *S. roseosporus*, el primer paso fue determinar su curva de crecimiento de *S. roseosporus* en diferentes medios y establecer si existe una relación entre esta y la producción del péptido Lasso. El crecimiento de *S. roseosporus* fue realizado en diferentes medios M20, M9, M63, LB, ISP2; inicia con filamentos vegetativos, una fase dominante en los cultivos líquidos después de 24 h, en esta fase el péptido Lasso no pudo ser detectado. Después de las 28 horas de cultivo se observó un aumento significativo en la desarticulación del filamento vegetativo (observación realizada en microscopio con tinción de verde de malaquita) para los medios M9, M63, M20 y LB excepto para el ISP2 que inicio esta fase después de 36 h. El análisis de estos medios de cultivo fue realizado por MALDI-TOFF, detectando un péptido en los medios ISP2 y LB con una $m/z_{obs} = 2006,12 \pm 0,6$ [M

$+ H]^+$, $m/z_{calc} = 2.006,02 [M + H]^+$, pero no fue detectado por RP-HPLC. Después de 5 días de incubación un aumento significativo de esporas predomina en los medios de cultivo y el péptido $m/z_{obs} = 2006,12 \pm 0,6$ fue débilmente detectado por RP-HPLC.

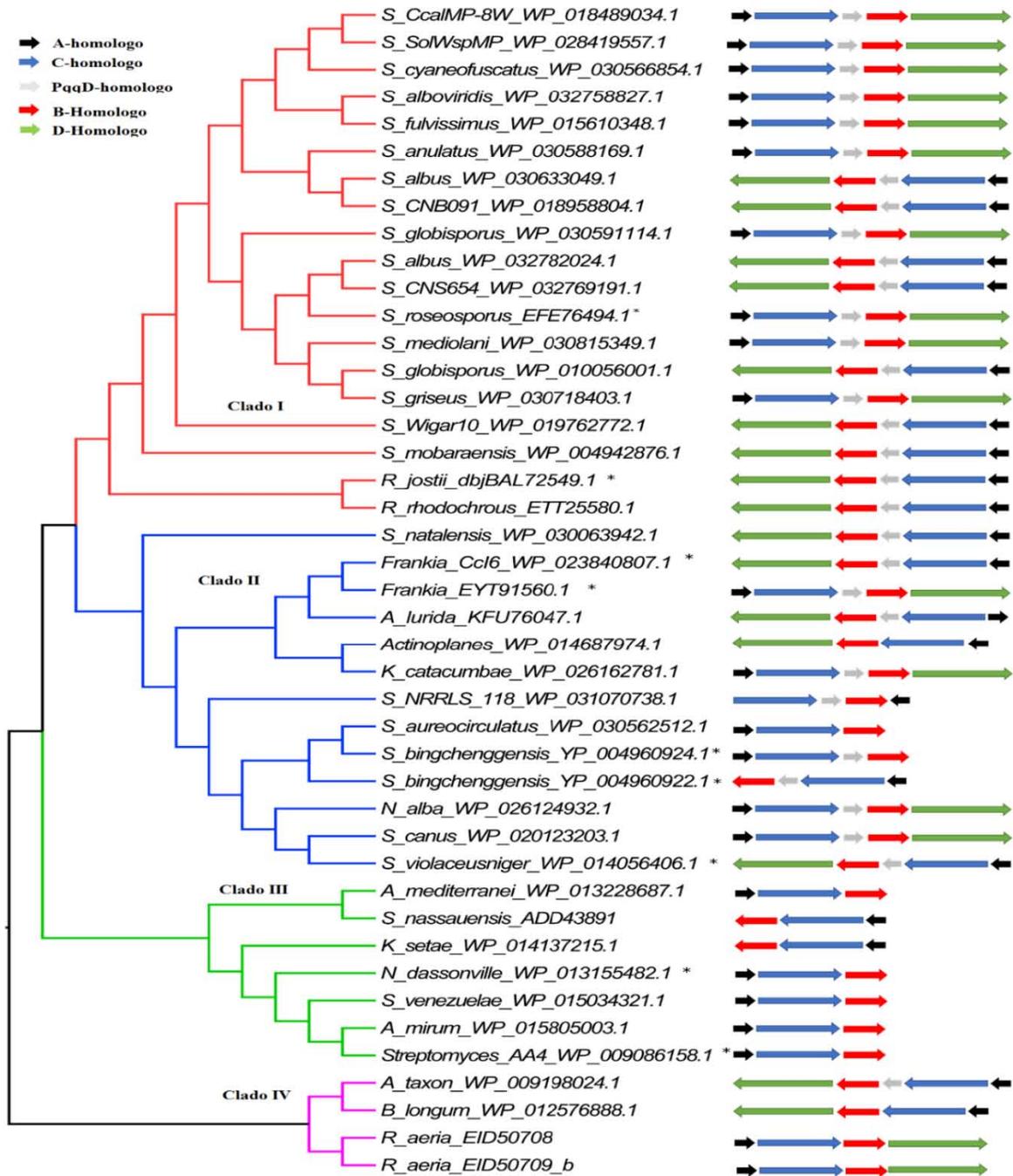


Figura 2.10. Árbol filogenético de los grupos biosintéticos obtenidos por minería genómica. Árbol filogenético basado en los grupos biosintéticos identificados en el phylum de Actinobacteria. La identificación de cuatro clados fue realizada, el primero un péptido es altamente conservado. En negro es el péptido precursor, azul homólogos de Asparagino sintetasa, en rojo homólogos de Transglutaminasa, en verde el ABC transportador y en gris el gen PqqD.

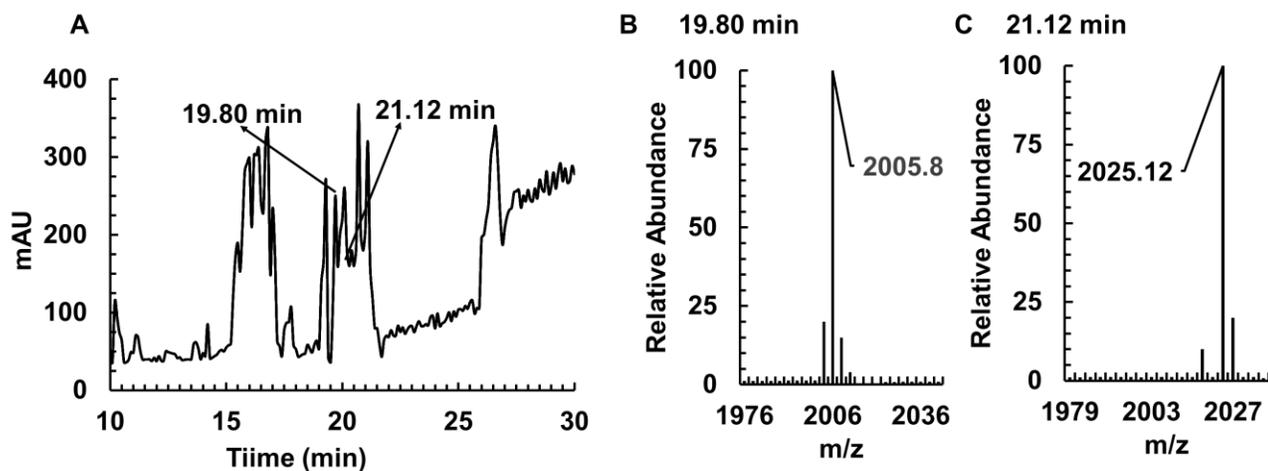


Figura 2.12. Expresión endógena. A). Cromatograma obtenido para la expresión endógena en medio sólido (ISP2-agar). B) y C) MALDI para los péptidos con un tiempo de retención de 19.80 min y 21.12 min respectivamente.

4.3 Expresión heteróloga de la SRO15-2005 Péptido

Debido a que las concentraciones de péptido obtenido por expresión endógena fueron muy bajas, la expresión heteróloga surge como una opción a seguir. Para esto, inicialmente se caracterizó el grupo biosintético sroACB1B2D, debido a que el gen C no presentaba una secuencia completa y es necesario conocer toda la secuencia para planear una metodología de sobreexpresión. El resultado demostró que el homólogo C tenía un tamaño de 2172 lb y no contenía el fragmento desconocido de pares de bases como la base de datos NCBI lo reportaba, obteniendo el grupo que se describe en la **Figura 2.13A**. El plásmido pNIC28-BSA4 se utilizó como vector para clonar sroACB1B2D; sin embargo el SRO15-2005 no fue detectado después de la inducción con IPTG.

Para mejorar la expresión de los péptidos lasso es común reemplazar la región intergénica del gen A y del C por un RBS (ribosomal binding site) optimizado; de esto se obtuvo el plásmido pNIC-sroArCB1B2D (**Figura 2.13B**). La sobre expresión de este plásmido en *E. coli* permitió la detección de tres péptidos con diferente tiempo de retención en el sobrenadante; dos de ellos con masa similar (péptido A y B) y un tercero con 18 Da más (péptido C) (**Figura 2.13C**). El rendimiento aumentó siete veces ($70 \pm 8 \mu\text{g} / \text{L}$) en comparación con la expresión impulsada por el promotor endógeno. La adición de betaína 1 mM al cultivo cuando se indujeron las células aumento el rendimiento hasta $80 \pm 10 \mu\text{g} / \text{L}$ (Tabla S2). El patrón de fragmentación de los péptidos A y B en MS² mostró un C-terminal libre y una falta de fragmentación congruente de los aminoácidos que constituyen el anillo de macrolactama. Un análisis detallado de la fragmentación confirma la ciclación de Gly1 a Glu9 [52] (**Figura 2.13D** y en la Tabla S3). Sin embargo, lo anterior no confirma que el C-terminal este atrapado en el anillo de macrolactama, para confirmar su plegamiento se utilizaron métodos bioquímicos.

4.4 Determinación de la topología lasso del SRO15-2005 por métodos bioquímicos

La estabilidad térmica y la sensibilidad a la carboxipeptidasa son técnicas que combinadas permiten la identificación diferencial entre la topología cíclica (donde el C-terminal no está atrapado en el N-terminal) y la topología lasso para los péptidos. El análisis se basa en la siguiente hipótesis, si el péptido analizado tiene una topología de lasso, el C-terminal es liberado del anillo después del tratamiento térmico, lo que con lleva a un cambio en el tiempo de retención en el RP-HPLC [81]. Por el contrario, si el péptido el C-terminal está libre no habrá cambio en el plegamiento y el tiempo de retención no se afecta. El tratamiento con carboxipeptidasa busca degradar los aminoácidos del extremo C-terminal de péptidos cíclicos y lineales, mientras que es incapaz de liberarlo cuando tienen una topología de lasso [81].

Los resultados obtenidos se resumen en:

1. Después de 5 h a 92 ° C, el péptido A tuvo un aumento de Tiempo de Retención (RT) y su patrón de fragmentación m/z no cambió. Este comportamiento indica que el tratamiento térmico no afectó ni derivó en subproductos de la secuencia (hidrolisis, oxidación, etc.), y la única explicación para el cambio de RT es un cambio conformacional que asumimos es por la liberación del C-terminal del anillo de caprolactama.
2. Péptido B no cambió su RT incluso cuando se mantuvo en tratamiento térmico durante más de 7 horas (**Figura 2.13E** y Tabla S4A) y su m/z permaneció igual. Lo que indica que el péptido B no tuvo cambios estructurales después del tratamiento térmico.
3. Péptido A no se degradó por la carboxipeptidasa Y antes del tratamiento térmico y fue degradado por la enzima después del tratamiento térmico. Esto indica que el tratamiento térmico expuso el C-terminal del péptido A y la carboxipeptidasa tuvo acceso a los aminoácidos que constituyen el C-terminal.
4. Péptido B se degrada enzimáticamente incluso antes del tratamiento térmico, esto indica que el C-terminal siempre estuvo expuesto. (**Figura 2.13F**).

Por último, la combinación de estos dos métodos bioquímicos demostró que el péptido A tiene una topología de tipo lasso y que los dos últimos residuos están expuestos y pueden ser degradados por la carboxipeptidasa, mientras que el péptido B es un topoisómero del SRO15-2005 donde el C-terminal está libre.

El péptido C mostró un patrón de RT y la fragmentación diferente, en comparación con los mostrados por el SRO15-2005 péptido lineal sintético, lo que significa que el péptido C no es lineal y no lleva una condensación en el N-terminal.

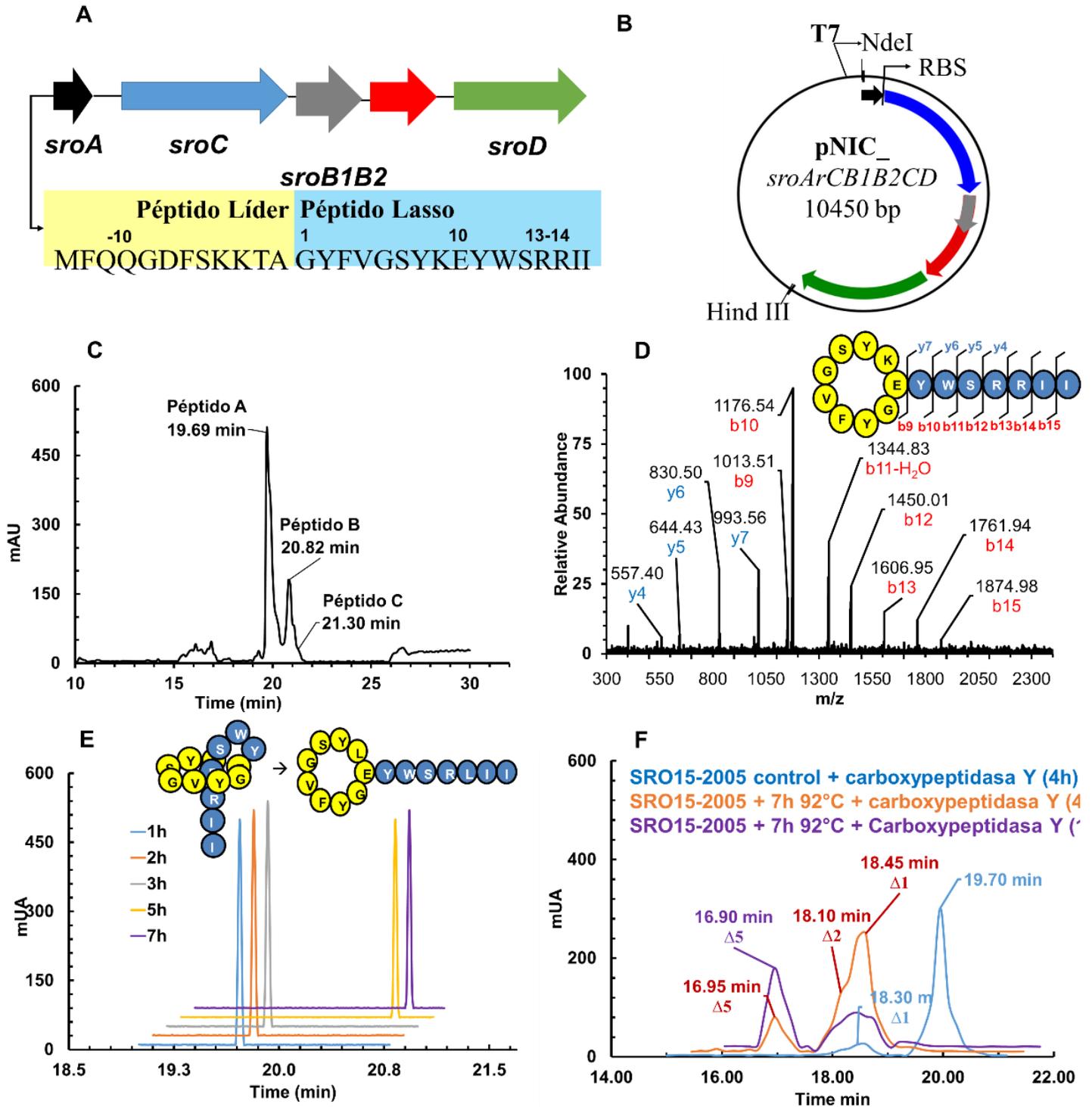


Figura 2.13. Expresión heteróloga y topología del péptido SRO15-2005. A). Clado biosintético del SRO15-2005. B). Expresión heteróloga sobre el plásmido pNIC-*sroArCB1B2CD* C). Cromatograma obtenido para un sistema en RP-HPLC de fase reversa en un sistema escalonado (La concentración de B (acetonitrilo-0.1% TFA incrementa linealmente de 0%-30% en 15 min y de 30%-35 en 10 min en la columna The Hibar 250, c18, 4-6) donde se obtuvo dos péptidos Péptido A y péptido B concordante con la masa del SRO152005; un tercer péptido con masa superior a la calculada por 18 Da. D) Espectro MS² para los péptidos obtenidos el mismo patrón de fragmentación y diferente tiempo de retención. E) Tratamiento térmico donde se observó que sólo un péptido tuvo cambio su tiempo de retención por efecto del tratamiento, indicando posible topología Lasso F) Tratamiento con carboxipeptidasa después del tratamiento térmico lo que permitió establecer que el péptido con tiempo de retención 19.69 tiene topología lasso.

4.5 Identificación de los residuos relevantes para el plegamiento tipo lasso: dinámica molecular

Luego de establecer que el péptido A tenía una conformación de tipo lasso, nos dimos a la tarea de establecer los residuos importantes para mantener esta topología. En la literatura se han reportado y caracterizado cuatro péptidos de clase II similares al SRO15-2005 con un tamaño de anillo de 9 aminoácidos: caulonodin [21 - 106], streptomomicin [107], astexin-1 [108] y capistruin [39]. Como se muestra en la Tabla S5, todos estos péptidos poseen diferentes residuos de estabilización y difieren en el tamaño C-terminal. Lo anterior significa que la identificación de los residuos que participan en el mantenimiento de esta topología de lasso no puede ser asignados por homología. Estudios previos han utilizado las mutaciones puntuales de toda la secuencia del péptido como método para identificar los residuos de estabilización. Con la hipótesis de que al mutar el residuo responsable de mantener el C-terminal dentro del anillo macrolactama la producción será inhibida. En este trabajo proponemos un enfoque alternativo, utilizando simulaciones de dinámica molecular como una herramienta para el diseño racional de variantes de SRO15-2005 y determinar que residuos son fundamentales en la estabilidad estructural. Para esto se analizó la conformación y la estabilidad a diferentes temperaturas de cinco modelos que difieren en las posiciones de los aminoácidos que componen el C-terminal (**Figura 2.14**) (**Figura S7**). Para analizar la evolución de las simulaciones, utilizamos tres parámetros de orden: desviaciones de raíz cuadrada media (RMSD), la distancia los carbonos gamma de Tyr7 y Trp11, que mide la asociación hidrofóbica entre estos dos residuos y la estabilidad. Por último, se determinó el número de enlaces de hidrógeno del péptido entre los aminoácidos que lo constituyen ya que esta medida se correlaciona con elementos de estructura secundaria [109] (**Figura 2.14**).

Todas las simulaciones muestran que no sólo el impedimento estérico es responsable de mantener la topología de Lasso, sino también el número de enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas entre el C-terminal y los residuos del anillo de macrolactama. Tal comportamiento ya se ha observado en estudios anteriores, donde se demostró que la atracción electrostática aumenta la estabilidad de los péptidos lasso [56].

Las conformaciones obtenidas para todos los modelos fueron mucho menores de lo esperado debido a la cantidad de interacciones que este péptido llega a tener. Una pérdida de interacciones intermoleculares de todos los sistemas estudiados se produjo cuando se aumentó la temperatura. La pérdida de estas interacciones, combinado con un aumento de la energía cinética del sistema, permite que el anillo aumente su radio y el C-terminal sea liberado. El perfil de parámetros de orden para los modelos CM2 y CM5 mostró un salto, lo que indica que hubo cambios estructurales a lo largo del curso de la simulación (**Figura 2.14**). En CM5, el número de enlaces de hidrógeno se redujo de cuatro a uno, y la distancia entre Tyr7 y Trp11 aumentó, mostrando que C-terminal fue liberado (**Figura 2.14**), lo mismo ocurrió cuando se aumentó la temperatura a tiempos menores de simulación.

El modelo CM1 mostró RMSD valores más altos y menos puentes de hidrógeno que los modelos CM2, CM3 y CM4 a cualquier temperatura. Curiosamente, algunas de las conformaciones obtenidas en el modelo CM1 no cumplieron con todas las restricciones Ramachandran, lo que indica que esta conformación es poco estable y por ende poco probable (**Figura S8**). Por último, el modelo CM1 tiene una Tyr 10 y Trp 11 como residuos estabilizadores del C-terminal, los cuales que ya han sido reportados como residuos de estabilización en muchos otros péptidos Lasso [98,108]. Sin embargo, el estar tan cercanos al enlace formado por la condensación es inusual. El péptido RES-701 con características similares a SRO15-2005 necesita poner entre los aminoácidos de estabilización y el primer aminoácido del C-terminal cuatro aminoácidos y tres residuos por debajo del anillo [47], lo que descarta al CM1.

Sorprendentemente, el modelo CM2 conserva la topología lasso aun cuando se incrementó la temperatura, sin embargo después de unos pocos nanosegundos, este modelo adopta la conformación CM3. El perfil del parámetro de orden mostró este cambio estructural, donde las variaciones en el número de hidrógeno y la distancia C γ -C γ alcanzaron los valores del modelo CM3. Por último los modelos C3 y C4 fueron altamente estables y los perfiles de parámetro de orden eran uniformes a diferentes temperaturas. Ambos modelos implican a Arg13 y a Arg14 como residuos de estabilización. Para confirmar esta predicción, mutaciones puntuales en estos residuos Arg13 y Arg14 se llevaron a cabo.

4.6 Variantes en Arg13 y Arg 14

Para confirmar la hipótesis sugerida por los resultados de dinámica molecular la sustitución Arg13 y Arg14 fue realizada con leucina para investigar su influencia en la producción y estabilidad de las variantes resultantes. Los resultados indican que las sustituciones son aceptadas y producidas pero con un rendimiento muy por debajo de lo esperado. La variante donde ambas argininas fueron remplazadas (R13L / R14L) no produjo un péptido detectable, lo que confirma que ambas argininas son residuos vitales para el mantenimiento de la topología de Lasso.

El patrón de fragmentación de variantes R13L y R14L concuerdan con un péptido cíclico, como se muestra en la (**Figura 2.15A, 2.15B**). La estabilidad térmica fue significativamente menor para la variante R14L, que necesita sólo una hora para cambiar su tiempo de retención (TR) y por ende liberación de su C-terminal. Por otra parte, la incorporación de Leu en la posición 13 (R13L) disminuyó su estabilidad térmica en comparación con el péptido SRO15-2005, pero fue más alta que la variante R14L (**Figura 2.15C, 2.15D**). Estos resultados sugieren que Arg14 podría ser el residuo más importante para el mantenimiento de la topología lasso. La digestión de la variante R14L con carboxypeptidasa mostró que este péptido es sensible a la digestión enzimática antes y después del tratamiento térmico. Caso contrario al de la variante R13L, que era sensible a la carboxipeptidasa Y sólo después del tratamiento térmico (**Figura 2.15E, 2.15F**). Estos resultados apoyan la hipótesis que la Arg14 es más

importante que Arg13 en la estabilización de la topología de Lasso, y que estos residuos podrían estar situados a lados opuestos del anillo de macrolactama.

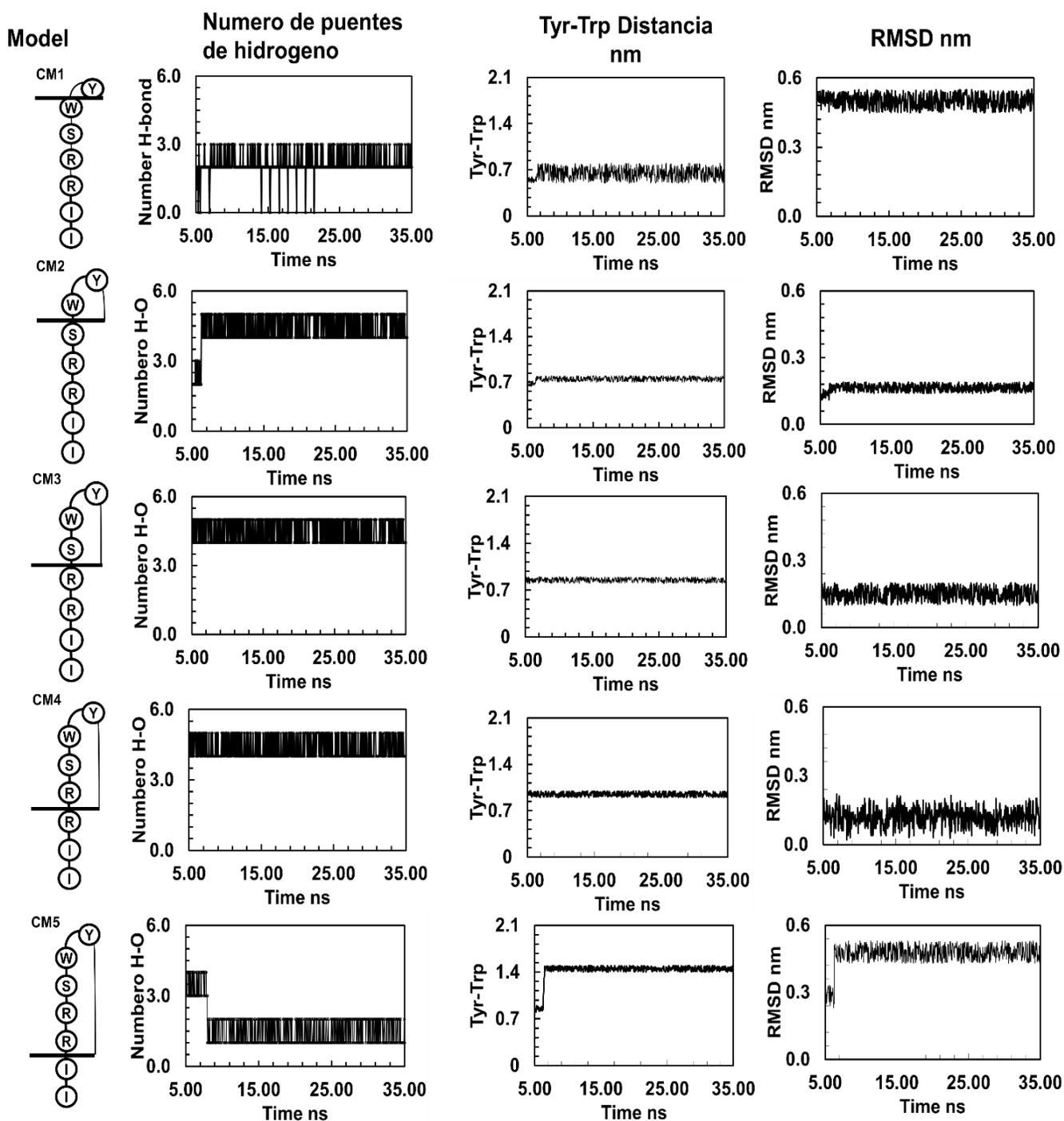


Figura 2.14. Comparación de parámetros de orden de los modelos CM1 a CM5 obtenidos por dinámica molecular. El primer panel muestra la variación de puentes de hidrógeno pertenecientes a la cadena del péptido. El segundo panel es la distancia en nm de la tirosina y triptófano uno perteneciente al anillo y otro al C-terminal. Por último el tercer panel es el RMSD de cada uno de los modelos. Los resultados muestran que cuando se utiliza a las Argininas como residuo de estabilización el sistema mantiene su conformación tipo Lasso, si se utilizan otros residuos del C-terminal esto no ocurre o se alcanzan conformaciones espaciales no congruentes.

4.7 Efecto del cambio en la densidad de carga del Anillo macrolactámico en la estabilidad

Las simulaciones de dinámica molecular mostraron que hay fuerzas intramoleculares entre el anillo macrolactámico y el C-terminal que mantienen la topología de lasso. Variantes, donde el Lys8, situada en el anillo de macrolactámico fue cambiado a la leucina (K8L), obteniendo una disminución en el rendimiento en comparación con el péptido SRO15-2005. Otras variantes, donde no solo el K8L y un residuo del C-terminal fue mutado como K8L / R13L y K8L / R14L tuvieron bajos rendimientos. La variante en la que los tres aminoácidos se cambiaron por leucina no fue detectada. Curiosamente, el tiempo de retención de la variante K8L/R14L no cambió después del tratamiento térmico pero si tiene sensibilidad a la carboxipeptidasa Y antes y después del tratamiento térmico. Estos resultados indican que esta variante no tenía una topología de Lasso. El K8L / R13L es menos estable al tratamiento térmico que el péptido SRO15-2005, y posee una estabilidad mayor que la mutante R14L. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por dinámica molecular y apoyan la hipótesis de que Arg14 es el aminoácido de estabilización de la topología de lasso.

5. Discusión

Nuestros resultados muestran que la metodología de minería genómica es una excelente herramienta que permite identificar nuevos péptidos lasso [2, 3]. La elección de la plantilla correcta como input inicial es determinante, debido a que esta secuencia tiene una relación implícita con el phylum [110, 111].

Con la plantilla SroB2 encontramos un conjunto de grupos filogenéticamente relacionados que no podría haber sido encontrados por el uso de plantillas de otros phyla. Con este enfoque bioinformático se identificó un conjunto de organismos filogenéticamente relacionados que contienen un péptido Lasso conservado y además relacionado por metabolismos similares [58- 60 112-114]. La alta conservación de los péptidos en el clado I destaca la presión selectiva a los que estos péptidos son sometidos, comportamiento que no se había reportado anteriormente para los péptidos Lasso. Lo anterior podría ser explicado considerando que el conjunto de organismos del clado I comparten un ancestro común.

El gen pqqD se detectó inicialmente en el grupo genes que codifica para el lariatín un péptido Lasso producido por *Rhodococcus jostii* [99]. Sorprendentemente, la presencia PqqD solamente se asoció con las proteínas homólogas B- y C-, y no con los D-homólogos, lo que sugiere que PqqD está involucrado únicamente en el proceso de maduración. Los motivos encontrados para las proteínas B y C nos permitieron encontrar fragmentos de secuencia relevantes para la maduración del péptido. Encontramos un motivo específico en los C-homólogos que estaba presente sólo en clado I que consta de 29 aminoácidos. Este motivo conservado podría tener un papel biológico importante que relaciona la secuencia peptídica Lasso con el complejo de maduración.

La expresión endógena del péptido Lasso SRO15-2005 fue mayor cuando provenía de cultivo sólidos, lo que sugiere que la producción de este péptido Lasso está determinada por la fase de crecimiento de *S. roseosporus* y sus condiciones de cultivo. [39, 115]. Sin embargo es posible que haya una condición en la que esta expresión del péptido es mayor, pero no fue encontrada en este trabajo

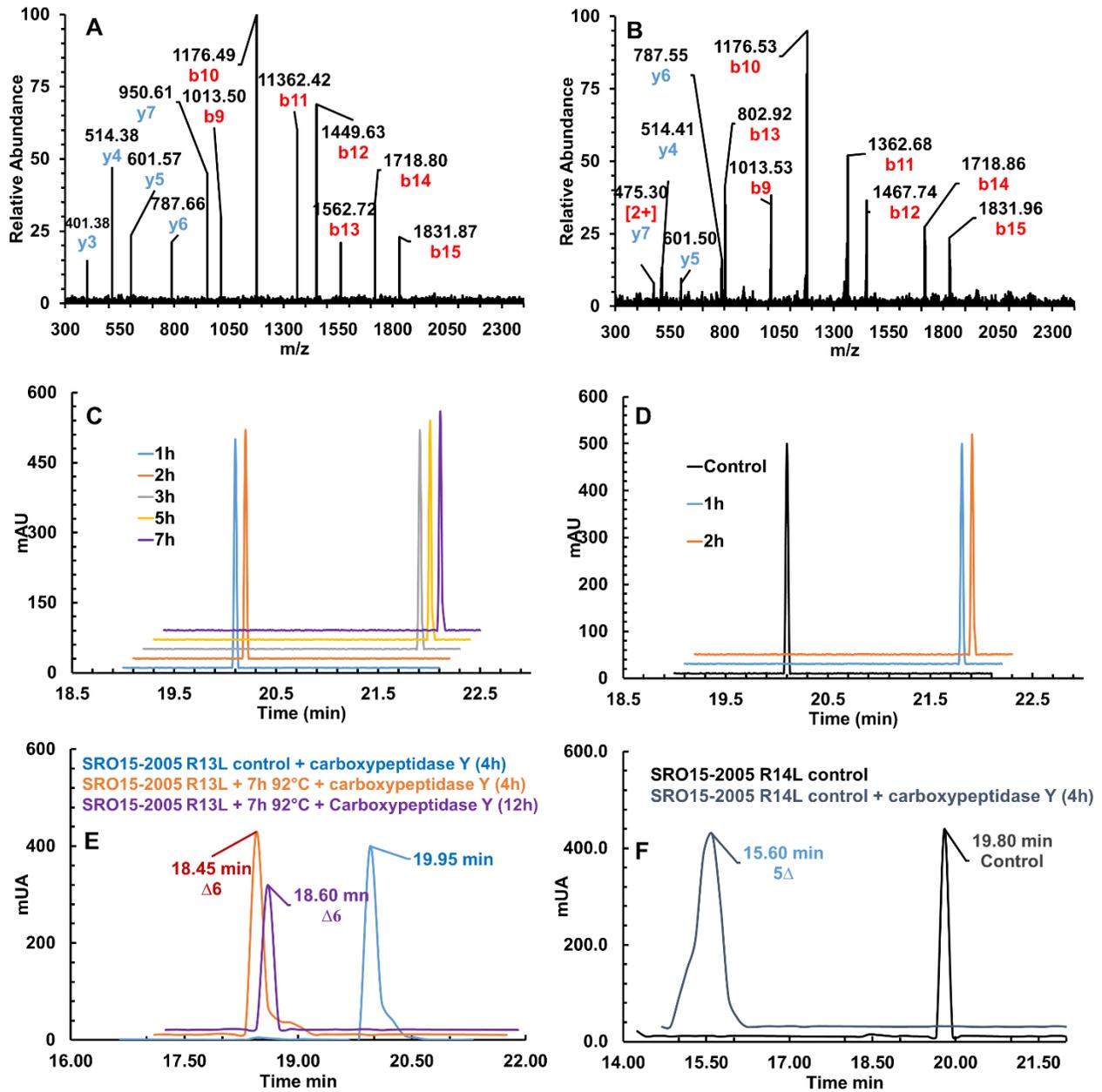


Figura 2.15 Purificación y estabilidad de las variantes R13L y R14L. A) y B) Patrón de fragmentación MS² para las variantes R13L y R14L, respectivamente. C) y D) Perfil cromatográfico antes y después del tratamiento térmico para R13L y R14L respectivamente. E) y F) perfil cromatográfico obtenido con el tratamiento de la carboxypeptidasa Y. Los resultados muestran la importancia de las dos argininas 13 y 14 y los puentes salinos en la estabilidad de la topología Lasso

Con el fin de determinar si el péptido SRO15-2005 tenía una topología Lasso, se comparó el tiempo de retención TR, y el patrón de fragmentación MS² y la digestión enzimática con carboxipeptidasa Y antes y después del tratamiento térmico. El cambio RT después del tratamiento térmico se asocia con la liberación de la C-terminal del anillo de macrolactama en un péptido lasso [108]. Con estos resultados hemos sido capaces de plantear la hipótesis de que Arg13 y Arg14 trabajaban como residuos de estabilización. Además, los resultados sugieren que Arg14 es más relevante para la estabilización que la Arg13, similar al péptido lasso capistraina producido por la *Burkholderia thailandensis* [39]. (**Figura 2.12**).

Hemos explorado la vecindad de genes sroACB1B2D en busca de genes con actividad isopeptidasa para explicar la presencia del péptido lineal, sin embargo no hemos encontrado genes que codifican enzimas con esta actividad. Se realizó una búsqueda BLAST en todo el genoma de *S. roseosporus*, con las secuencias AtxE1 y ATX2 isopeptidasas que rompe el anillo de macrolactama el péptido Lasso Astexin, pero la búsqueda no encontró proteínas homologas [116]. Estudios filogenéticos muestran que la falta de la proteína homologa D en el complejo enzimático se asocia con la presencia de isopeptidasas [116], debido a que la proteína D confiere inmunidad al organismo productor y su falta se compensarían con la expresión de una isopeptidasa [116]. Sin embargo nuestro grupo de genes contiene un homólogo D, por lo tanto todos los argumentos anteriores descartan una enzima isopeptidasa y por ende no se puede explicar la presencia del péptido lineal. Se considera entonces que el péptido lineal encontrado es un intermediario de la biosíntesis del péptido.

6. Conclusiones

En este trabajo, hemos aplicado un enfoque de minería genoma para explorar la pertinencia del uso de una plantilla B-homologa que tiene una relación filogenética con los genomas analizados. Nuestro análisis mostró que el grupo biosintético SRO15-2005 se conserva en diferentes organismos; esta alta similitud puede deberse a que todos tienen un origen común que nos permite decir que existe una presión selectiva evolutiva para conservar y mantener este grupo en diferentes organismos. ¿Cuáles son las ventajas de mantener este grupo? ¿Se trata de una cuestión relacionada la función del péptido Lasso en *S. roseosporus*? Nuestros resultados indican que estos péptidos podrían servir como defensa biológica contra otras bacterias por disrupción de la membrana. Aunque la existencia del péptido SRO15-2005 había sido predicha por espectrometría de masas [100], no se había determinado plenamente que tenía una topología de lasso. Pudimos determinar que el SRO15-2005 tiene una estructura de lasso a través MS², análisis térmico, y digestión enzimática por carboxipeptidasa Y. Además, a través de la dinámica molecular, fue posible identificar que Arg13 y Arg14 podrían trabajar como residuos de estabilización. Este resultado fue confirmado por la construcción y el análisis de un conjunto de variantes de péptidos, donde se sustituyeron Arg13 y Arg14 de leucina. Simulaciones MD y parámetros de orden pueden ser

considerados como herramientas valiosas para el diseño racional de variantes de péptidos para determinar los residuos relevantes para la topología de lasso.

7. Bibliografía

1. A. Demain, *Med Res Rev*, 2009, 29, 821-42.
2. C. Corre, G. Challis, *Nat Prod Rep* 26., 2009, 977-86.
3. M. Zerikly, G. Challis, *Chembiochem.*, 2009, 10, 625-33.
4. H. Bode, B. Bethe, R. Hof, A. Zeeck, *Chembiochem.*, 2002, 3, 619-27.
5. K. Scherlach, C. Hertweck, *Org Biomol Chem.*, 7, 2009, 1753-60.
6. D. Udvary, L. Zeigler, et al, Moore, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2007, 104, 10376-81.
7. H. Gross, V. Stockwell, M. Henkels, B. Thompson, et al, *Chem Biol.*, 2007, 14, 53-63.
8. S. Caboche, M. Pupin, V. Leclere, A. Fontaine, et al, *Nucleic Acids Res.*, 2008 36, D326-31.
9. J. Willey, W. van der Donk, *Annu Rev Microbiol.*, 2007, 61, 477-501.
10. J. A McIntosh, M. Donia, E. Schmidt, *Prod Rep.*, 2009, 26, 537-59.
11. G. Bulaj, B. Olivera, *Antioxid Redox Signal.*, 2008, 10, 141 - 55.
12. D. Craik, J. Mylne, N. Daly, *Cell Mol Life Sci.*, 2010, 67, 9-16.
13. R. Lehrer, T. Ganz, *Curr Opin Immunol* 14., 2002, 96-102.
14. K. Kawulka, T. Sprules, R. McKay, P. Mercier, et al, *J Am Chem Soc.*, 2003, 125, 4726-7.
15. T. Oman, W. van der Donk, *Nat Chem Biol.*, 2010, 6, 9-18.
16. M. Maqueda, M. Sanchez Hidalgo, M. Fernandez, et al, *FEMS Microbiol Rev.*, 2008, 32, 2-22.
17. S. Rebuffat, A. Blond, D. Destoumieux, et al, *Curr Protein Pept Sci.*, 2004, 5, 383-91.
18. M. Selsted, *Curr Protein Pept Sci.*, 2004, 5, 365-71.
19. N. Heng, J. Tagg, *Nat Rev Micro.*, 2006,
20. M. Lotierzo, B. Tse Sum Bui, D. Florentin, et al, *Biochem Soc Trans.*, 2005, 33, 820-3.
21. S. Wang, P. Frey, *Trends Biochem Sci.*, 2007, 32, 101-10.
22. P. Frey, A. Hegeman, F. Ruzicka, *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 2008, 43, 63-88.
23. F. Bordusa, *Chem Rev.*, 2002, 102, 4817-68.
24. M.S Donia, J. Ravel, E. Schmidt, *Nat Chem Biol.*, 2008, 4, 341-3.
25. A. Jones, L. Gu, M. Sorrels, D. Sherman, et al, *Curr Opin Chem Biol.*, 2009 13, 216-23.
26. C. Ireland, A. Durso, et al, *The Journal of Organic Chemistry.*, 1982, 47, 1807-1811.
27. J. Hoffmann, F. Kafatos, C. Janeway, R.A Ezekowitz, *Science.*, 1991 284, 1313-8.
28. M. Selsted, D. Brown, R. DeLange, S. Harwig, R. Lehrer, *J Biol Chem.*, 1985, 260, 4579-84.
29. G. Diamond, M. Zasloff, H. Eck, et al, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1991, 88, 3952-6.
30. Y. Tang, J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, et al, *Science.*, 1991, 286, 498-502.
31. M. Selsted, *Curr Protein Pept Sci.*, 2004, 5, 365-71.
32. Rebuffat, S., Blond, A., Destoumieux, D, et al, *J, Curr Protein Pept Sci.*, 2004 5, 383-91.
33. K. I. Kimura, F. Kanou, H. Takahashi, et al, *J. Antibiot.*, 1997, 50, 373-378.
34. G. Helynck, C. Dubertret, J. F. Mayaux and J. Le Boul, *J. Antibiot.*, 1993, 46, 1756-1757.
35. K. I. Kimura, F. Kanou, H. Takahashi, Y. Esumi, et al, *J. Antibiot.*, 1997, 50, 373-378.
36. Y. Morishita, S. Chiba, E. Tsukuda, et al, *J. Antibiot.*, 1994, 47, 269-275.
37. O. Potterat, K. Wagner, G. Gemmecker, et al, *J. Nat. Prod.*, 2004, 67, 1528-1531.
38. M. Iwatsuki, H. Tomoda, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 7486-7491.
39. T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 11446-11454.
40. K. Severinov, E. Semenova, A. Kazakov, T. Kazakov and M. S. Gelfand, *Mol. Microbiol.*, 2007, 65, 1380-1394.
41. O. A. Pavlova and K. V. Severinov, *Russ. J. Genet.*, 2006, 42, 1380- 1389.

42. R. D. Kersten, Y.-L. Yang, Y. Xu, P. Cimermancic, S.-J. Nam, W. Fenical, M. A. Fischbach, B. S. Moore and P. C. Dorrestein, *Nat. Chem. Biol.*, 2011, 7, 794–802.
43. J. E. Velasquez and W. A. van der Donk, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, 15, 11–21.
44. J. A. McIntosh, M. S. Donia and E. W. Schmidt, *Nat. Prod. Rep.*, 2009, 26, 537–559.
45. H. Nar, A. Schmid, C. Puder and O. Potterat, *ChemMedChem*, 2010, 5, 1689–1692.
46. K. A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov and S. A. Darst, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 12475–12483.
47. R. Katahira, K. Shibata, M. Yamasaki, Y. Matsuda and M. Yoshida, *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, 3, 1273–1280.
48. D. Frechet, J. D. Guitton, F. Herman, D. Faucher, G. Helynck, B. M. Dusorbier, J. P. Ridoux, E. James-Surcouf and M. Vuilhorgne, *Biochemistry*, 1994, 33, 42–50.
49. R. Katahira, M. Yamasaki, Y. Matsuda and M. Yoshida, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, 4, 121–129.
50. K. L. Constantine, M. S. Friedrichs, D. Detlefsen, M. Nishio, M. Tsunakawa, T. Furumai, H. Ohkuma, T. Oki, S. Hill, R. E. Bruccoleri, P. F. Lin and L. Mueller, *J. Biomol. NMR*, 1995, 5, 271–286.
51. M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. T. Swapna, J. Y. Huang, L. C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione and R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 12382–12383.
52. K. J. Rosengren, R. J. Clark, N. L. Daly, U. Goransson, A. Jones and D. J. Craik, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 12464–12474.
53. M. Iwatsuki, H. Tomoda, R. Uchida, H. Gouda, S. Hirono and S. Omura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 7486–7491.
54. T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. L. Xie and M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 11446–11454.
55. T. A. Knappe, U. Linne, X. L. Xie and M. A. Marahiel, *FEBS Lett.*, 2010, 584, 785–789.
56. A. L. Ferguson, S. Y. Zhang, I. Dikiy, A. Z. Panagiotopoulos, P. G. Debenedetti and A. J. Link, *Biophys. J.*, 2010, 99, 3056–3065.
57. K. J. Rosengren, A. Blond, C. Afonso, J. C. Tabet, S. Rebuffat and D. J. Craik, *Biochemistry*, 2004, 43, 4696–4702.
58. R. A. Salomon and R. N. Farias, *J. Bacteriol.*, 1992, 174, 7428–7435.
59. J. O. Solbiati, M. Ciaccio, R. N. Farias and R. A. Salomon, *J. Bacteriol.*, 1996, 178, 3661–3663.
60. J. O. Solbiati, M. Ciaccio, R. N. Farias, J. E. Gonzalez-Pastor, F. Moreno and R. A. Salomon, *J. Bacteriol.*, 1999, 181, 2659–2662.
61. S. Duquesne, D. Destoumieux-Garz on, S. Zirah, C. Goulard, J. Peduzzi and S. Rebuffat, *Chem. Biol.*, 2007, 14, 793–803.
62. A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne and E. L. L. Sonnhammer, *J. Mol. Biol.*, 2001, 305, 567–580.
63. S. J. Pan, J. Rajniak, W. L. Cheung and A. J. Link, *ChemBioChem*, 2012, 13, 367–370
64. M. A. Delgado, P. A. Vincent, R. N. Farias and R. A. Salomon, *J. Bacteriol.*, 2005, 187, 3465–3470.
65. K. S. Makarova, L. Aravind and E. V. Koonin, *Protein Sci.*, 1999, 8, 1714–1719.
66. D. J. Clarke and D. J. Campopiano, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, 5, 2564–2566.
67. W. L. Cheung, S. J. Pan and A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 2514–2515.
68. S. J. Pan, J. Rajniak, M. O. Maksimov and A. J. Link, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 1880–1882.
69. G. Helynck, C. Dubertret, J. F. Mayaux and J. Leboul, *J. Antibiot.*, 1993, 46, 1756–1757.
70. Y. Morishita, S. Chiba, E. Tsukuda, T. Tanaka, T. Ogawa, M. Yamasaki, M. Yoshida, I. Kawamoto and Y. Matsuda, *J. Antibiot.*, 1994, 47, 269–275.
71. M. J. Chiuchiolo, M. A. Delgado, R. N. Farias and R. A. Salomon, *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 1755–1764.
72. R. Ducasse, K. P. Yan, C. Goulard, A. Blond, Y. Y. Li, E. Lescop, E. Guittet, S. Rebuffat and S. Zirah, *ChemBioChem*, 2012, 13, 371–380.
73. S. Zirah, C. Afonso, U. Linne, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, S. Rebuffat and J. C. Tabet, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, 22, 467–479.
74. J. A. Loo, J. X. He and W. L. Cody, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 4542–4543.
75. S. J. Pan, W. L. Cheung and A. J. Link, *Protein Expression Purif.*, 2010, 71, 200–206.

76. O. Pavlova, J. Mukhopadhyay, E. Sineva, R. H. Ebright and K. Severinov, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 25589–25595.
77. T. A. Knappe, U. Linne, L. Robbel and M. A. Marahiel, *Chem. Biol.*, 2009, 16, 1290–1298.
78. S. J. Pan, W. L. Cheung, H. K. Fung, C. A. Floudas and A. J. Link, *Protein Eng., Des. Sel.*, 2011, 24, 275–282.
79. S. J. Pan and A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 5016–5023.
80. G. Helynck, C. Dubertret, J. F. Mayaux and J. Leboul, *J. Antibiot.*, 1993, 46, 1756–1757.
81. M. Tsunakawa, S. L. Hu, Y. Hoshino, D. J. Detlefsen, S. E. Hill, T. Furumai, R. J. White, M. Nishio, K. Kawano, S. Yamamoto, Y. Fukagawa and T. Oki, *J. Antibiot.*, 1995, 48, 433–434.
82. O. Potterat, H. Stephan, J. W. Metzger, V. Gnau, H. Zahner and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, 1994, 741–743.
83. W. Weber, W. Fischli, E. Hochuli, E. Kupfer and E. K. Weibel, *J. Antibiot.*, 1991, 44, 164–171.
84. O. Potterat, K. Wagner, G. Gemmecker, J. Mack, C. Puder, R. Vettermann and R. Streicher, *J. Nat. Prod.*, 2004, 67, 1528–1531.
85. T. Tanaka, E. Tsukuda, M. Nozawa, H. Nonaka, T. Ohno, H. Kase, K. Yamada and Y. Matsuda, *Mol. Pharmacol.*, 1994, 45, 724–730.
86. M. A. Delgado, M. R. Rintoul, R. N. Farias and R. A. Salomon, *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 4543–4550.
87. M. R. Rintoul, B. F. de Arcuri, R. A. Salomon, R. N. Farias and R. D. Morero, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, 204, 265–270.
88. A. Bellomio, P. A. Vincent, B. F. de Arcuri, R. N. Farias and R. D. Morero, *J. Bacteriol.*, 2007, 189, 4180–4186.
89. P. A. Vincent, M. N. A. Delgado, R. N. Farias and R. L. A. Salomon, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 236, 103–107.
90. K. Kuznedelov, E. Semenova, T. A. Knappe, D. Mukhamedyarov, A. Srivastava, S. Chatterjee, R. H. Ebright, M. A. Marahiel and K. Severinov, *J. Mol. Biol.*, 2011, 412, 842–848.
91. M. Iwatsuki, Y. Koizumi, H. Gouda, S. Hirono, H. Tomoda and S. Omura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 2888–2890.
92. N. Ziemert, K. Ishida, A. Liaimer, C. Hertweck and E. Dittmann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 7756–7759.
93. J. M. Willey and W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007, 61, 477–501.
94. V. Braun, K. Schaller and H. Wolff, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1973, 323, 87–97.
95. S. B. Socias, K. Severinov and R. A. Salomon, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 301, 124–129.
96. K. Hantke and V. Braun, *FEBS Lett.*, 1975, 49, 301–305.
97. R. Ducasse, Y. Li, A. Blond, S. Zirah, E. Lescop, C. Goulard, E. Guittet, J. L. Pernodet, *J. Pep. Sci.* 18., 2012, 18 ((Suppl)), 67–68.
98. M. Maksimov, I. Pelczer, J. Link, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, 109, 15223–15228.
99. J. Inokoshi, M. Matsuhama, M. Miyake, H. Ikeda, H. Tomoda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 95 (2), 451–460.
100. D. Kersten, Y. Yang, Y. Xu, P. Cimermanic, W. Fenical, M. Fischbach, *Nat. Chem. Biol.*, 2012, 7 (11), 794–802.
101. K. Constantine, K. L.; Friedrichs, M. S.; Detlefsen, D.; Nishio, M.; Tsunakawa, *Biomol., NMR* 1995, 5, 271–286.
102. J. Hegemann, M. Zimmermann, S. Zhu, H. Steuber, K. Harms, X. Xie, M. Marahiel, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2014, 53 (8), 2230–2234.
103. S. Gadagkar, M. Rosenberg, S. Kumar, *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 2005, 304 (1), 64–74.
104. J. Degnan, N. Rosenberg, *PLoS Genet.* 2006, 2 (5), e68.
105. M. Maksimov, S. Pan, L. Link, *Nat. Prod. Rep.* 2012, 29 (9), 996.
106. M. Zimmermann, J. Hegemann, X. Xie, M. Marahiel, *Chem. Sci.* 2014, 5, 4032–4043.
107. M. Metelev, J. Tietz, K. Severinov, D. Mitchell, M. Metelev, J. Tietz, J. Melby, P. Blair, L. Zhu, I. Livnat, *Chem. Biol.* 2015, 22 (2), 241–250.

- 108.** M. Zimmermann, J. Hegemann, X. Xie, M. Marahiel, *Chem. Biol.* 2013, 20 (4), 558–569.
- 109.** M. Seibert, A. Patriksson, B. Hess, D. Van Der Spoel, *Mol. Biol.* 2005, 354 (1), 173–183.
- 110.** I. Choi, S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103 (38), 14056–14061.
- 111.** Y. Xia, M. Levitt, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004, 14 (2), 202–207.
- 112.** J. Jiménez, M. Sturdíková, V. Brezová, E. Svajdlenka, M. Novotová, *J. Microbiol.* 2012, 50 (6), 1014–1023.
- 113.** A. Daza, J. Martín, A. Dominguez, J. Gil, *J. Gen. Microbiol.* 1989, 135 (9), 2483–2491.
- 114.** D. Labeda, J. Doroghazi, K. Ju, W. Metcalf, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, 64 (PART 3), 894–900.
- 115.** E. Robles-Gomez, M. Flores-Villegas, A. Gonzalez-Manjarrez, M. Soriano-Garcia, *Protein Pept. Lett.* 2013, 20 (5), 489–498.
- 116.** M. Maksimov, J.A Link, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 12038–12047.

CAPITULO III

DETERMINACIÓN DEL MODELO INTERACCIÓN DE MEMBRANA PARA UN PÉPTIDO CON RESTRICCIONES CONFORMACIONALES SRO15-2005 Y UN PÉPTIDO ALEATORIO CON LA MISMA ESTRUCTURA PRIMARIA.

1. Introducción

Este capítulo evalúa la interacción de un péptido con impedimento estérico (péptido lasso) y uno con libertad de movimiento (péptido aleatorio) con respecto a membranas sintéticas para entender el efecto de la estructura en el modelo de interacción y su efecto en el modelo cinético planteado. Las isotermas de adsorción y los ensayos de fluorescencia muestran un claro ejemplo de que la restricción estructural puede dirigir el mecanismo de acción del péptido. El comportamiento disimilar de estos dos péptidos frente a las vesículas nos permite hipotetizar que la restricción conformacional de péptidos de origen natural puede ser una alternativa evolutiva para la especialización de estos en otras funciones. Los ensayos de fluorescencia muestran que el péptido aleatorio puede formar poros en la membrana mientras los péptidos lasso no lo hacen. Las isotermas de adsorción complementan la información anterior demostrando que el péptido aleatorio genera multicapas en la superficie membranal antes de generar el poro, que conceptualmente se puede relacionar a un modelo tipo carpeta. El péptido lasso, por el contrario, no genera poros y su isoterma de adsorción es similar a un sistema de monocapa. El modelo cinético apoya la teoría de formación de multicapas para el péptido aleatorio ya que su valor de constante es mayor a la encontrada para péptidos lasso. La formación de multicapas o agregados es el primer paso a un fenómeno de formación de una fase líquida. Para el péptido Lasso las constantes de desorción y adsorción están alejadas completamente del valor de la difusión, lo que indica que el péptido está gobernado por otro mecanismo de interacción.

2. Estrategia experimental

1. Evaluar el comportamiento del péptido aleatorio y el péptido Lasso por fluorescencia, liberación de calceína e isotermas de adsorción como ya se realizaron en el capítulo uno y simular los parámetros obtenidos con el modelo cinético planteado para caracterizarlo por medio de constantes cinéticas.

Flujo de calceína

El flujo de calceína es fuertemente sigmoideal para el péptido lineal SRO15L-2005 a pequeñas concentraciones de lípido (la concentración de péptido es constante y la concentración de lípidos varía) como se muestra en la (**Figura 3.1**). Eso sugiere que es necesario una serie de pasos iniciales o procesos cooperativos antes de que la liberación del fluoróforo ocurra [1-2]. La evaluación de la velocidad inicial de liberación de calceína revela que depende de la relación concentración lípido-péptido. Esta observación también ha sido registrada en otros trabajos y demuestra la necesidad de llegar a una relación crítica péptido-lípido para obtener poros en la membrana. Como conclusión la adsorción de un número de péptidos lineales es un paso primordial para la formación de poros y posterior liberación de calceína.

Con respecto al péptido lasso SRO15-2005, no presenta liberación del flujo de calceína como se muestra en la **Figura 3.2** lo que indica que el péptido no genera poros en la membrana. Este comportamiento puede entenderse desde varias perspectivas: la primera considera que el péptido no interacciona con la membrana y la segunda asume la existencia de procesos de difusión pasiva a través de la membrana y aglomerándose en el espacio intermembranal o al interior de la vesícula.

Isotermas de adsorción en fase líquida

El comportamiento de las isotermas de adsorción donde la concentración de péptido varía y la concentración de vesículas permanece constante es mostrado en la **Figura 3.3A**. Para el péptido lineal observamos que la isoterma se puede dividir en tres sectores: a bajas concentraciones de péptido la adsorción es inmediata; a regiones intermedias de concentración existe una acumulación de péptido en la membrana; y por último, a concentraciones altas se forma una fase condensada en la vesícula.

El péptido lasso SRO15-2005 a concentraciones bajas de péptido es adsorbido rápidamente y a una mayor concentración de péptido en solución, la vesícula no supera una cantidad de péptido adsorbida y se establece un equilibrio dinámico entre el péptido en solución y el péptido adsorbido **Figura 3.3B**.

Efecto en el cambio de carga del péptido

Para el péptido lineal, se sintetizaron péptidos con cambios en los aminoácidos catiónicos por un aminoácido hidrofóbico como se muestra en la **Tabla 3.1**. El comportamiento para estos péptidos es demostrado en la (**Figura 3.3B**). Como resultado general observamos que a medida que la carga del péptido disminuye, el tiempo necesario para que la liberación de la calceína inicie aumenta, al igual que la velocidad de adsorción. Esto se explica por qué la afinidad con la membrana disminuye rápidamente.

Con respecto al péptido lasso solo una variante pudo ser analizada ya que la baja concentración obtenida para las demás variantes no permitió este análisis. Para la variante R13L, el resultado muestra que la capacidad de adsorción de la vesícula disminuyó a comparación con la de SRO15-2005. El resultado obtenido es explicado de manera similar a la presentada para el péptido lineal.

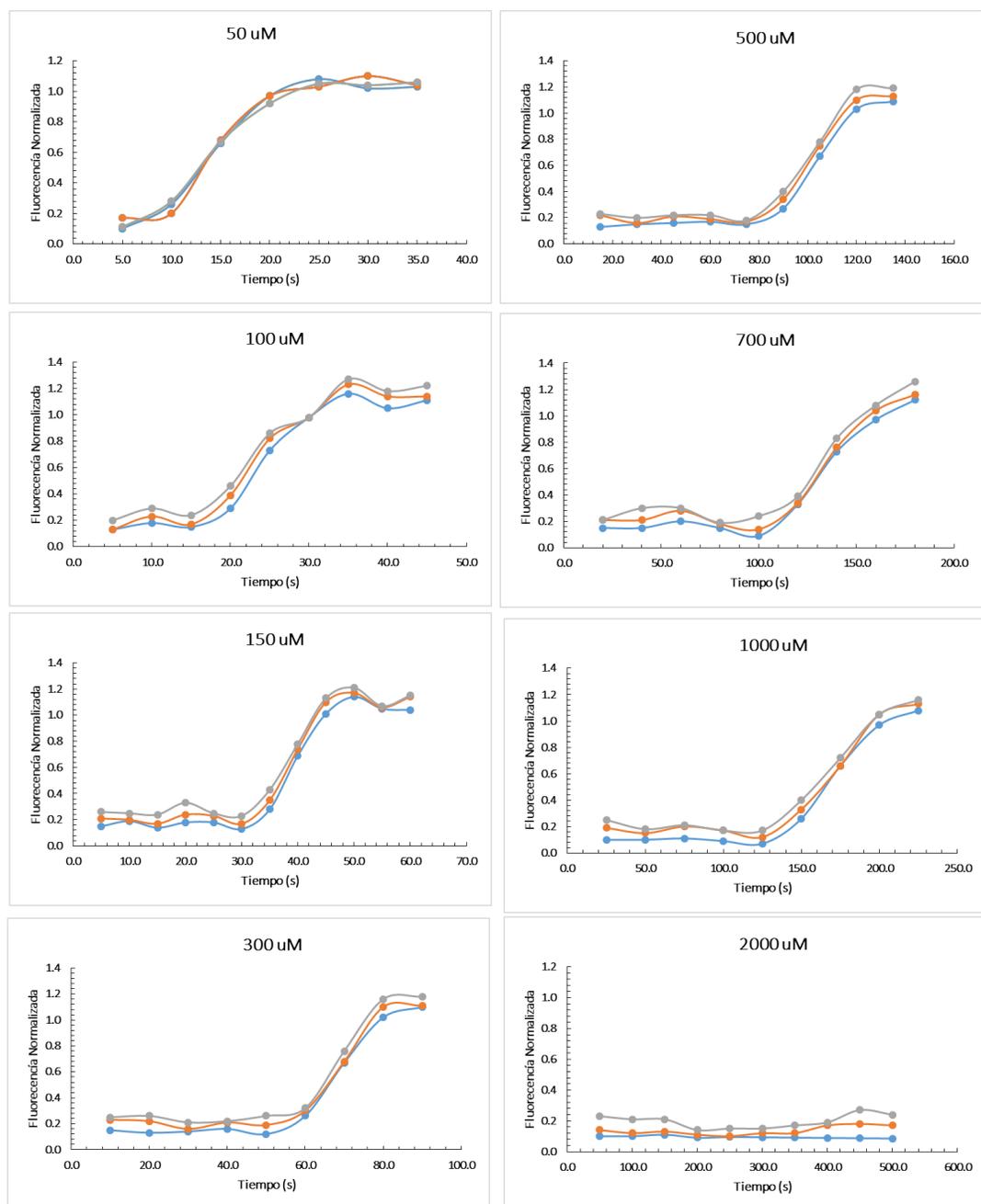


Figura 3.1 Flujo del calceína a diferentes concentraciones de lípido (POPC LUV) 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina cuando se situó en contacto con 10 μM de SRO15L-2005 (tres repeticiones). Las curvas corresponden a diferentes concentraciones de lípido A) 50 μM ; B) 100 μM ; C) 150 μM ; D) 300 μM ; E) 500 μM ; F) 700 μM ; G) 1000 μM , H) 2000 μM . Los resultados demuestran que la liberación total de la calceína se alcanza a menor concentración de lípido (altas concentraciones de péptido en comparación del lípido). A 2000 μM el péptido ya no puede formar poros en la membrana

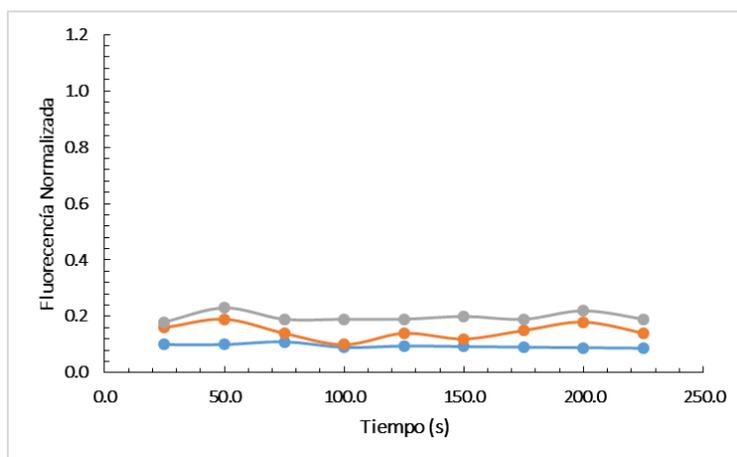


Figura 3.2 Flujo del calceína LUV compuestas por 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfolina 50 μM cuando se encuentra en contacto con 10 μM del péptido lasso SRO15-2005. Los resultados demuestran que no hay liberación de calceína a ninguna concentración de lípido.

Tabla 3.1. Secuencias utilizadas para determinar el efecto estructural y de carga

| Nombre | Secuencia | Conformación en medio acuoso | Carga |
|-----------------|--|------------------------------|-------|
| SRO15L-2005 | G ¹ YFVGSYKEYWSRRII ¹⁶ | Lineal | +2 |
| R14L | G ¹ YFVGSYKEYWSRLII ¹⁶ | Lineal | +1 |
| R14L /R13L | G ¹ YFVGSYKEYWSLLII ¹⁶ | Lineal | 0 |
| K8L/ R14L /R13L | G ¹ YFVGSYLEYWSLLII ¹⁶ | Lineal | -1 |
| SRO15-2005 | G ¹ YFVGSYKEYWSRRII ¹⁶ _____ | Péptido lasso | +3 |
| SRO15-2005 R14L | G ¹ YFVGSYKEYWSRLII ¹⁶ _____ | Péptido lasso | +2 |

Evaluación del cambio estructural por TFE

Mediante el dicroísmo circular se evaluó la conformación en solución acuosa que estos péptidos alcanzan cuando es agregado el trifluoroetanol. Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en la región de (180-260 nm), con un barrido de 10 nm/min, un ancho de banda de 1 nm, 0.5 nm de resolución. 5 barridos se llevaron a cabo, se acumularon y se promediaron para cada muestra. Una concentración de 0.250 mg/mL del péptido lasso y lineal se usó en agua y en diferentes solventes (M9, agua/TFE). El aumento en la concentración de TFE de 0 a 60% v/v se realizó en incrementos de 10%. La elipticidad molar es una medida en $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, calculada usando la fórmula: $[\theta] = [\theta_{\text{obs}}]/10lcd$. Donde (θ) es la elipticidad observada en milideg l es el número de residuos, c es la concentración molar del péptido y, por último, d es el ancho de la celda [3]. La composición de elementos

de estructura secundaria es analizada usando un software basado en redes neuronales CDNN versión 2.1 que utiliza un conjunto de 13 proteínas simples y un conjunto de 33 proteínas complejas.

Los resultados obtenidos muestran que el péptido lineal SRO15L-2005 y las variantes tienen una tendencia general a formar alfa-hélices y el péptido lasso no cambia su estructura confirmando el impedimento estérico al que está sometido (**Figura 3.4**).

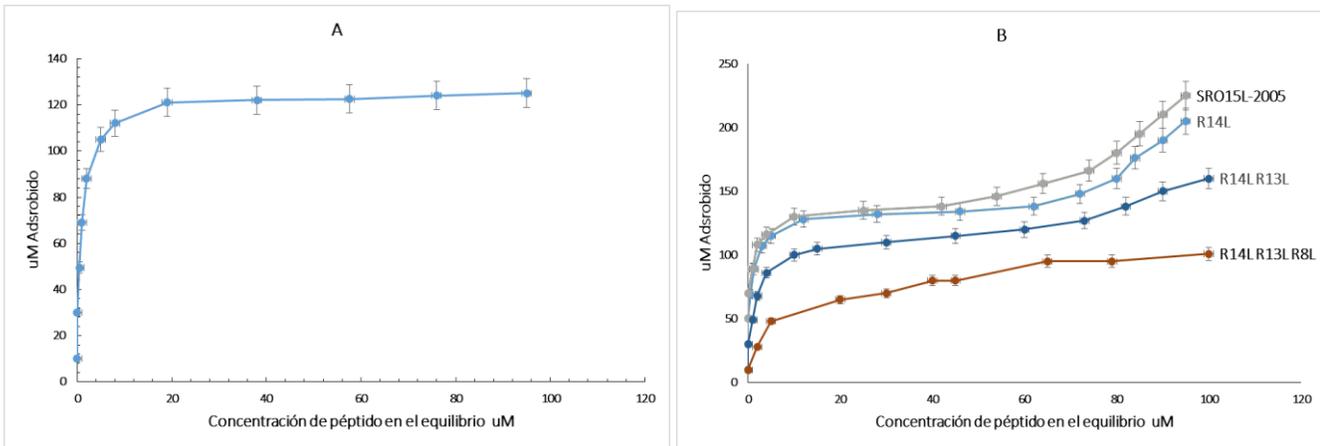


Figura 3.3 Isothermas de Adsorción. A) Isotherma de adsorción del péptido Lasso B) Isotherma de adorcion de los péptidos lineales SRO15L-2005, R14L, R14LR13L, K8L/R13L/R14L. EL comportamiento observado demuestra que las vesículas adsorben el péptido lasso hasta una concentración límite. Caso contrario para el peptido lineal, donde la vesícula puede adsorber mucho mas péptido. Este comportamiento puede ser explicado asumiendo que existe una formación de multicapas de péptido lineal en la superficie de la membrana.

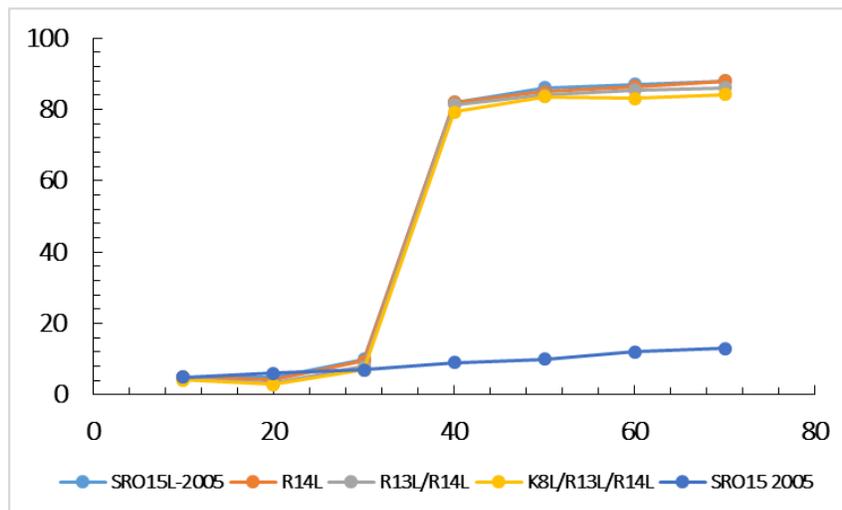


Figura 3.4 Porcentaje de helicidad en función de la concentración de TFE. Los resultados demuestran que los péptidos lineales sintéticos tienden a la formación de alfa hélices a medida que el porcentaje de TFE. Lo anterior indica que cuando el péptido es sometido a un ambiente limitado en moléculas de agua tiende a adquirir la conformación alfa-hélice. Con respecto al péptido lasso, el porcentaje de helicidad no cambia debido a su impedimento estérico.

Asegurando la reversibilidad de la reacción

Para asegurarnos que el proceso es reversible, se planteó un experimento que evaluó la reacción reversa. Un contenedor con vesículas sin calceína fueron incubados con los péptidos lineales y el 1asso, permitiendo alcanzar el equilibrio. Estas suspensiones fueron mezcladas con vesículas cargadas con calceína (aceptores) de tal manera que la concentración final estuviera en los niveles de lo realizado para las isotermas de adsorción. El experimento se realizó con a bajas y altas concentraciones. Esto se debe a que debemos evaluar la reversibilidad cuando el fenómeno de adsorción gobierna el proceso (bajas concentraciones) y cuando existen fases condensadas sobre la vesícula (altas concentraciones). La hipótesis radica en que si el proceso es reversible, sin importar si relación péptido vesícula existe, los péptidos adsorbidos en la membrana de las vesículas sin calceína serán desorbidos a vesículas con calceína, liberándola y generando fluorescencia al medio.

Los resultados para los péptidos lineales se muestran en la (Figura 3.5). En ambas condiciones se demuestra que el proceso es reversible; sin embargo, la velocidad en que se detecta la calceína en el medio difiere. El proceso es más lento cuando la concentración de péptido es menor, indicando que existe una barrera inicial que dificulta la desorción del péptido a las vesículas con calceína. Cuando la concentración es alta la velocidad de liberación de calceína aumenta. Lo anterior se explica de la siguiente manera, cuando hay grandes cantidades de péptido tiende a la formación de multicapas o fases condensadas sobre la vesícula lo que permite una fácil desorción del péptido. Por el contrario, a bajas concentraciones, el péptido se encuentra estabilizado por las interacciones electrostáticas en la interfase membrana-líquido y su liberación toma más tiempo.

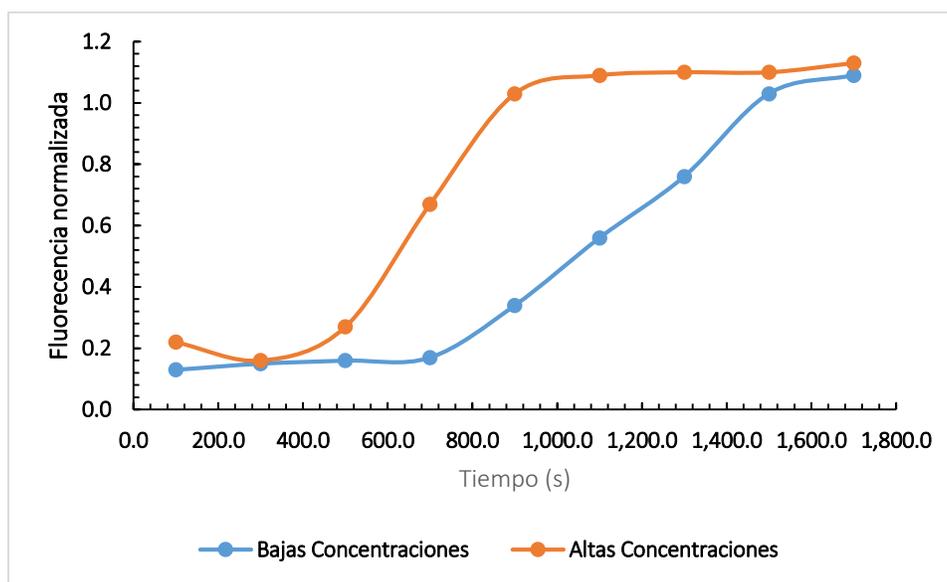


Figura 3.5 Reversibilidad del fenómeno de adsorción a altas concentraciones (300 μM) y bajas concentraciones (100 μM). El comportamiento indica que el péptido adsorbido en las vesículas sin calceína se desorbe y ataca a las vesículas con calceína, asegurando la reversibilidad del fenómeno. La velocidad de liberación de calceína indica que, a concentraciones elevadas, el sistema genera una fase condensada en la superficie que puede desorberse fácilmente y a concentraciones bajas de péptido este queda adsorbido.

Estabilidad de las vesículas y el péptido

Para determinar si las vesículas eran estables en los tiempos usados para realizar las isotermas de adsorción se realizó un análisis de variación del radio hidrodinámico a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de péptido lasso y péptido lineal. Los resultados demuestran que, después de la primera hora, la estabilidad de las vesículas empieza a disminuir, por lo que los experimentos nunca superaron este límite de tiempo.

La aglomeración de péptidos en solución fue determinada analizando los cambios de tensión superficial del sistema por picnometría a 30°C a medida que la concentración de péptido aumenta, los resultados demuestran que en las concentraciones trabajadas nunca se alcanzó la concentración micelar crítica, lo que nos permitió asumir que la interacción entre péptido y vesículas nunca se llevó en agregados.

Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue medida por difusión radial (medición del halo de inhibición) contra *E. coli* K12, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Aerococcus Viridans*, y *Staphylococcus aureus*. Cuando se obtenía un resultado positivo se determinó la concentración mínima inhibitoria. Los resultados muestran que el péptido lineal tiene una alta actividad contra bacterias Gram-Negativas como Gram Positivas. Por el contrario, el péptido lasso no genera actividad, lo que indica que la estructura disminuye esa capacidad. **Tabla 3.2**

Tabla 3.2 Actividad antimicrobiana para los diferentes péptidos obtenidos. Los valores reportados es la concentración mínima inhibitoria. Controles positivos kanamicina para Gram negativas y Oxacilina.

| Cepa | SRO15L-2005 | R14L | R13/R14L | K8L/R13/R14L | SRO15-2005 Péptido lasso | SRO15-2005 R14L Péptido lasso |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>E.coli</i> K12 | 10 μ M | 50 μ M | 100 μ M | NO | NO | NO |
| <i>S. enterica</i> | 30 μ M | 125 μ M | NO | NO | NO | NO |
| <i>E. cloacae</i> | 100 μ M | NO | NO | NO | NO | NO |
| <i>A Viridans</i> | NO | NO | NO | NO | NO | NO |
| <i>S. aureus</i> | NO | NO | NO | NO | NO | NO |

Obtención de las constantes cinéticas usando al modelo cinético planteado

La concentración residual del péptido SRO15L-2005 y el péptido lasso que no fue adsorbido por las vesículas fue medida a través de HPLC en función del tiempo. La **Figura 3.6** muestra el comportamiento obtenido para las diferentes variantes del péptido lineal. Las concentraciones trabajadas están correlacionadas

con la isoterma de adsorción; a concentraciones intermedias se presenta el fenómeno de condensación, mientras que a concentraciones altas se forman poros.

En la **Figura 3.6A y 3.6B** observamos el comportamiento obtenido para el péptido lineal y sus variantes. Los puntos son los datos experimentales y la línea sólida representa el modelamiento con base en las ecuaciones cinéticas planteadas en el capítulo I. Los resultados muestran que a medida que la carga del péptido disminuye la velocidad de adsorción disminuye. Lo anterior también afecta significativamente a la concentración de equilibrio entre el péptido adsorbido y el desorbido; a mayor carga, la cantidad de péptido en la solución acuosa disminuye.

Con respecto al péptido lasso, las curvas obtenidas son muy similares a las obtenidas para el péptido lineal; lo que se observa es que el péptido establece rápidamente el equilibrio y tiende a estar adsorbido. La variante de SRO15-2205 R14L disminuye su velocidad de adsorción y por ende establece el equilibrio a concentraciones en solución más altas.

Los valores obtenidos para las constantes de asociación y desorción respaldan los datos obtenidos; a mayor carga mayor constante de asociación y a menor carga mayor constante de desorción **Tabla 3.3**. Para el péptido lasso los valores muestran una tendencia significativa a la asociación con la membrana y un parámetro de desorción bajo.

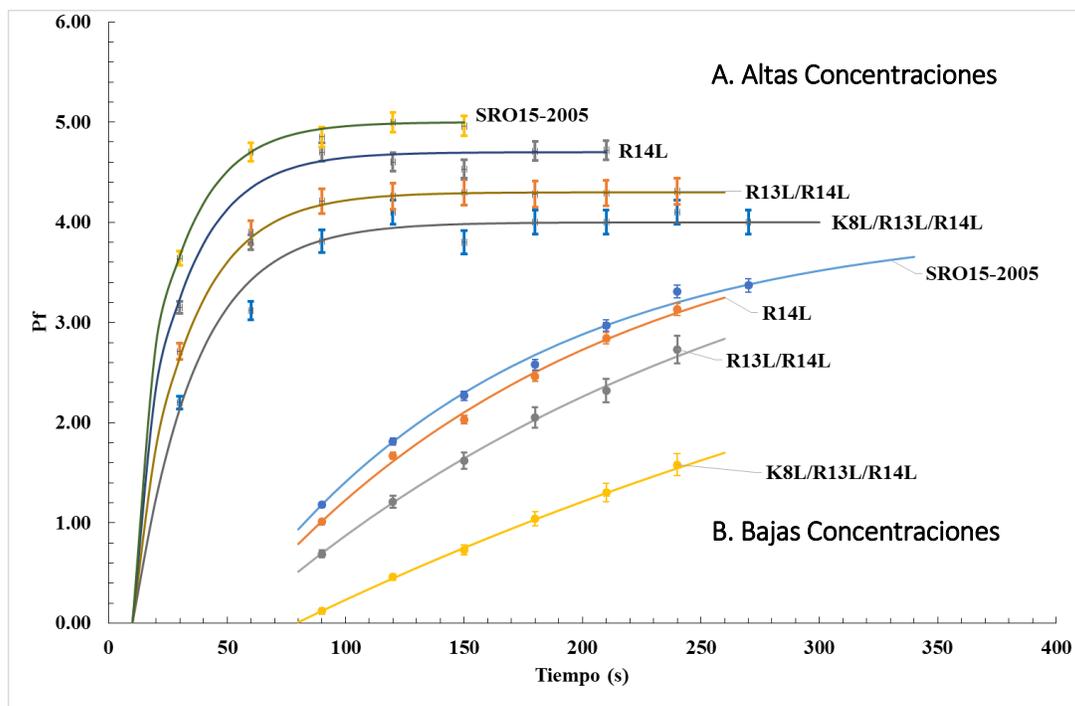


Figura 3.6 Aplicación del modelo cinético a los datos obtenidos para los péptidos lineales. Los puntos son los datos experimentales y las líneas son los modelados. Como se puede observar los datos teóricos y experimentales concuerdan desde un 96 a un 99%.

Tabla 3.3 Parámetros obtenidos a partir del modelo cinético.

| | SRO15-2005 | R14L | R13L/R14L | K8L/R13L/R14L | SRO15-2005 Péptido Lasso |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| $k_f (M^{-1} s^{-1}/C^*)$ | 1.39×10^{-4} | 1.34×10^{-4} | 1.28×10^{-4} | 1.22×10^{-4} | 1.56×10^{-4} |
| $k_s (s^{-1})$ | 1.93×10^{-2} | 2.02×10^{-2} | 2.12×10^{-2} | 2.22×10^{-2} | 1.78×10^{-3} |

4. Discusión

Basados en los resultados obtenidos, demostramos que el modelo cinético no se ve afectado por cambios estructurales del péptido, sin embargo podemos asegurar que el impedimento estérico dirige la interacción con la membrana. Como se muestra en la **Figura 3.1** la liberación del fluoróforo depende de la relación en concentración péptido lineal-lípido lo que significa que es necesario alcanzar una relación crítica para que el fluoróforo sea liberado. Esta interpretación anudada con la isoterma de adsorción indica que antes de llegar a una concentración crítica es necesario que los péptidos lineales formen una fase condensada en la superficie de la vesícula **Figura 3.2**.

La forma de isoterma para el péptido lineal con vesículas es común observarla para sólidos micro, meso y macro porosos, los primeros adsorben muy rápidamente al adsorbato, los segundos necesitan más adsorbato para ser llenados y por último los macroporosos se consideran sistemas donde se presenta condensación del adsorbato. Por consiguiente al aumentar el diámetro disminuye la capacidad de retención del adsorbato en el sólido. Un comportamiento análogo es presentado aquí, aunque concebir una vesícula como un sistema con porosidad es un error, si podemos asumir que el sistema esta interaccionando tan fuertemente como un microporo y tan débilmente como un macroporo.

Asumimos que el péptido lineal al entrar en contacto con la vesícula puede cambiar de estructura hacia la formación de alfa hélices como se demuestra en la **Figura 3.3**, donde al agregar un captador de moléculas de agua, el péptido lineal y sus variantes tienden a la formación de alfa hélices. Suponemos que esto mismo ocurre cuando el péptido lineal interacciona con la superficie de la vesícula para estabilizar las interacciones, dirigiendo sus caras polares hacia la membrana y exponiendo la cara no-polar al espacio extracelular. Esta capacidad del péptido en modificar su momento hidrofóbico le permite a otro péptido asociarse por interacciones hidrofóbicas al péptido inicial generando una aglomeración de péptido. Luego de esa aglomeración el péptido perturba a la membrana de tal manera que puede generar poros y la liberación de la calceína tiene lugar. Esta serie de pasos está de acuerdo con lo expuesto para la δ -lysina y su modelo tipo carpeta

El entender como la estructura dirige un modelo de interacción es algo que debe ser analizado y se deben de construir modelos que respalden este comportamiento. Los resultados obtenidos muestran que el cambio o la restricción estructural dirigen la manera de interacción del péptido, como se observó en los resultados obtenidos para el péptido lasso y el péptido lineal (misma secuencia pero diferente estereoquímica). El efecto es tan dramático que los ensayos microbiológicos demuestran que la actividad antimicrobiana de los dos péptidos es completamente diferente frente a un mismo organismo (**Tabla 3.2**). Una interpretación a esto podría ser que el péptido lasso tiene esta divergencia estructural porque está diseñado contra organismos que se encuentran en su hábitat del organismo productor o debido a que el mecanismo de interacción depende de la concentración. Optimizar un péptido contra un objetivo interno es mucho más eficiente que la formación de poros en la membrana. Los parámetros cinéticos están en concordancia con las interacciones electrostáticas que el péptido puede generar con la vesícula, una observación que ha sido bien documentada. Sin embargo, es importante reconocer que sus valores son muy alejados a un proceso difusivo simple que indica que procesos adicionales afectan esta magnitud. Para el caso de la constante de adsorción, nosotros suponemos que el cambio conformacional afecta este valor y para la constante de desorción asumimos que la liberación del péptido de la membrana debe estar impulsada por rompimiento de las interacciones entre péptido y vesícula.

Para el péptido lasso asumimos que las interacciones electrostáticas guían la adsorción pero ya una vez en la membrana, su momento hidrofóbico lo ayuda a permanecer o penetrar a la membrana. La anterior hipótesis justifica el comportamiento de la isoterma de adsorción la cual es similar a fenómenos sólidos con microporos donde existe un solo sitio activo específico.

5. Conclusiones

1. La estructura es un parámetro decisivo en el mecanismo de interacción, lo que abre la posibilidad de diseñar péptidos que traspasen una membrana por modificación estructural, una capacidad importante para el acarreamiento de moléculas de interés biológico.
2. Las constantes cinéticas encontradas a partir del modelo cinético planteado están relacionadas implícitamente con la carga del péptido en solución, o que es lo mismo, la capacidad que tiene un péptido en generar interacción electrostática.
3. La combinación entre el modelo cinético y las isotermas de adsorción en fase líquida nos permite plantear un modelo en el cual la formación de una fase condensada del péptido en la superficie de la vesícula es un paso importante en la formación de poros.

4. La relación crítica entre péptido-lípido puede ser una consecuencia intuitiva de la necesidad de la formación inicial de una fase condensada, más que una magnitud sujeta a la interacción con la membrana.

6. Bibliografía

1. Wyman, J., and Gill, S. J. (1990) *Binding and Linkage. Functional chemistry of biological macromolecules*, University Science Books, Mill Valley, CA.
2. Gutfreund, H. (1995) *Kinetics for the Life Sciences*, Cambridge University Press, New York.

APENDICE CAPITULO I

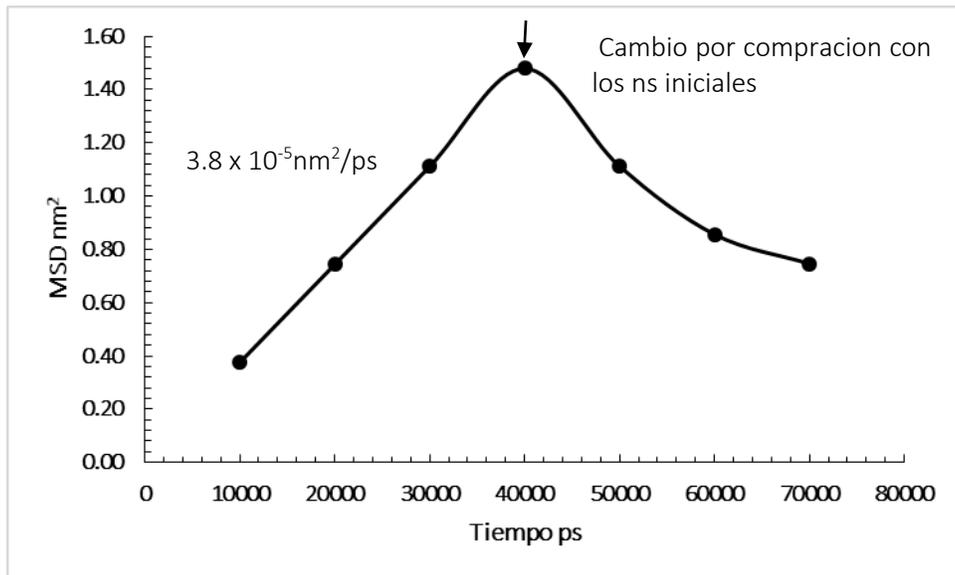


Figura S1. Desplazamiento lateral de los lipidos que conforman la membrana. La velocidad de desplazamiento es constante pero a medida que el peptide 1F9R se despliega la velocidad de despliegamiento disminuye.

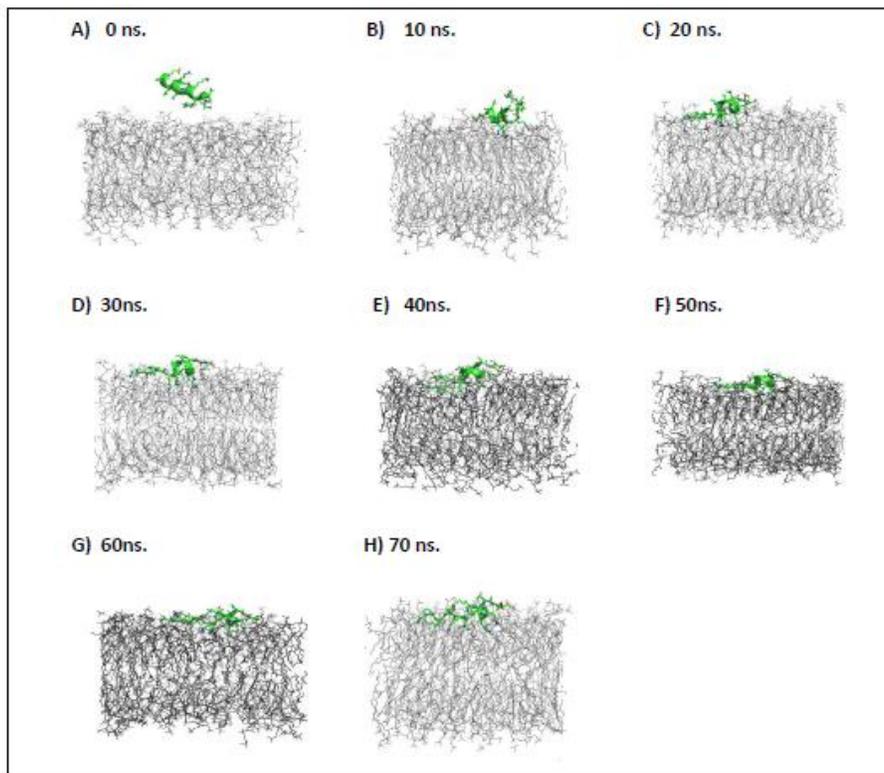


Figura S2 Transicion de los peptidos en la membrana a través del tiempo.



Figura S3. Cambio conformacional del peptido 1FR9 a medida que la simulación ocurre

APÉNDICE CAPÍTULO 2

TABLA S1. Resultados obtenidos por minería genómica centrada en la proteína B para el phylum de Actinobacteria

*Peptidos líderes no canonicos.

| N° | Organismo | Código* | Secuencia | Ta ¹ | Clad ² | Ca | clase |
|-----------------|---|----------------|---|-----------------|-------------------|----|-------|
| 1 | <i>Bifidobacterium longum</i> | WP_012576888.1 | MKDYVPPAVEVIASFKEATNGVWFGNYVDVGGAKAPFPWGSN | 9 | IV | Si | II |
| 2 | <i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827 | WP_015805003.1 | MALLPEQWNEPPEHTTDGTPSGHDAPVLLTSIGDMSSVTLGQKGSAEDKRRAYN | 8 | III | Si | II |
| 3 | <i>Actinomyces sp. oral taxon 848</i> | WP_009198024.1 | MATYVSPAIEQIADYTDTRGWYRGPWTDVFGGRAIVKVDVARPW | 9 | IV | Si | II |
| 4 | <i>Stackebrandtia nassauensis</i> | ADD43891 | MNTKKTARRTRYARPTVLLGDAVKLTNGGQYNDTHDSRQYYY | 9 | III | Si | II |
| 5 ^a | <i>S. roseosporus</i> NRRL 11379 | EFE76494.1 | MQKSVGHNGRQPRRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWSRRII | 9 | I | Si | II |
| 6 ^a | <i>Nocardiopsis dassonville</i> | WP_013155482.1 | MDNTKAEDQTHEELLVELGDAADLTGQGRAQNEKRNPNY | 8 | III | Si | II |
| 7 ^a | <i>Streptomyces bingchenggensis</i> | YP_004960922.1 | MEMQARSDETVESYEPALVAVGEFSEDTLGFHRYEDVLGEQGWG | 7/8 | II | Si | II |
| 8 ^a | <i>Streptomyces bingchenggensis</i> | YP_004960924.1 | MVTEAGDFSEVTAGSIFGFQYDGGFYPSQYG | 9 | II | Si | II |
| 9 ^a | <i>Streptomyces sp. AA4</i> | WP_009086158.1 | MSKRKKEDEMENVPEENGADRAERGRAVEEPPVLLVSLGEVSAATQGLGMGHSEDKRRAYN | 9 | II | Si | II |
| 10 | <i>Streptomyces venezuelae</i> | WP_015034321.1 | MTDLPRTEEAPAGAENVLDIGDAAELTQGGGGQSEDKRRAYNC | 8/9 | III | Si | II |
| 11 | <i>Amycolatopsis mediterranei</i> | WP_013228687.1 | MNDADVDPNLIVPEDGYEPPAVDFGPFVKTTRGNGNGSVDKSSQED | 8 | III | Si | II |
| 12 ^b | <i>Rhodococcus jostii</i> | BAL72549.1 | MTSQPSKTYNAPSLVQRGKFARTTAGSQLVYREWVGHNSVIKPGP | 8 | I | Si | II |
| 13 | <i>Rothia aeria</i> | EID50708 | MYIKARFMKMNSFADCTHGLIYGKYRDVLSGARLVTPPEVAL | 9 | IV | Si | II |
| 14 | <i>Rothia aeria</i> | EID50709 | MQCTPKQRSKLLPLSRLLMDGTGGIVVIFTEPSGTLISSIFAFG | 8 | IV | Si | II |
| 15 | <i>Streptomyces fulvissimus</i> | WP_015610348.1 | MKLQKKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRIVY | 9 | I | Si | II |
| 16 | <i>Streptomyces albus</i> | WP_032782024.1 | MHKPVRHNGRQPHRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWSRRII | 9 | I | Si | II |
| 17 | <i>Streptomyces sp. CNS654</i> | WP_032769191.1 | MHTSVRHNGRQPHRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWSRRII | 9 | I | Si | II |
| 18 | <i>Streptomyces griseus subsp.</i> | WP_030718403.1 | MQRPVTHNGRQPHRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWTRRIV | 9 | I | Si | II |
| 19 | <i>Streptomyces globisporus</i> | WP_010056001.1 | MQTPVAHNGRQPHRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWTRRII | 9 | I | Si | II |
| 20 | <i>Streptomyces anulatus</i> | WP_030588169.1 | MQRLFHNGRQPHYRREGVMKQQKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWTRRIV | 9 | I | Si | II |
| 21 | <i>Streptomyces globisporus</i> | WP_030591114.1 | MKQKQKQKAYVKPSMHQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWTRRII | 9 | I | Si | II |
| 22 | <i>Streptomyces mediolani</i> | WP_030815349.1 | MQKSVGHNGRQPHRREGVMKQQKQKQKAYVKPSMFQQGDFSKKTAGYFVGSYKEYWTRRII | 9 | I | Si | II |
| 23 | <i>Streptomyces albus</i> | WP_030633049.1 | MQLSVGHNGRQPHRREGVMKQQKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRII | 9 | I | Si | II |
| 24 | <i>Streptomyces sp. SolWspMP-sol2th</i> | WP_028419557.1 | MRPPVGHNGRQPHRREGVMKQQQEKAKKAYMKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRII | 9 | I | Si | II |
| 25 | <i>Streptomyces sp. CcalMP-8W</i> | WP_018489034.1 | MRTPVGHNGRQPHRREGVMKQQQEKAKKAYMKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRII | 9 | I | Si | II |
| 26 | <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> | WP_030566854.1 | MKQKQKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRII | 9 | I | Si | II |
| 27 | <i>Streptomyces sp. CNB091</i> | WP_018958804.1 | MKLRKKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRIS | 9 | I | Si | II |
| 28 | <i>Streptomyces sp. Wigar10</i> | WP_019762772.1 | MRTAVGHNGRQPHRREGVMKQQEKAKKAYMKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRII | 9 | I | Si | II |
| 29 | <i>Streptomyces albobiviridis</i> | WP_032758827.1 | MQTPVGHNGRQPHRREGVMKQQKAYVKPSLFKQGDFFSKKTAGYFVGSYKEYWVRRIVY | 9 | I | Si | II |
| 30 | <i>Streptomyces mobaraensis</i> | WP_004942876.1 | MKKNYMKPTLFKQGDFTKKTAGWFMSKKS ENLWTRIGGS | 9 | I | Si | II |

| N° | Organismo | Código* | Secuencia | Ta | Clado ¹ | Canonic | Clase |
|-----------------|--|----------------|---|----|--------------------|---------|-------|
| 31 | <i>Streptomyces sp. NRRL S-118</i> | WP_031070738.1 | MILSAPSGPGLRGPDCPRRSRSGPHGTVG ^{PLFRW} DRGSLSTTADPV | 7 | II | Si | II |
| 32 | <i>Kribbella catacumbae</i> | WP_0203875 | MREYERPTVIEAGDFGQETAG ^{SGGHNW} EWIDAWGW | 8 | II | Si | II |
| 33 | <i>Streptomyces aureocirculatus</i> | WP_030562512.1 | MVEVGDFTELTR ^{GEALGAHY} EGGFPPYEWYLGPN | 9 | II | Si | II |
| 34 | <i>R. rhodochrous ATCC 21198</i> | ETT25580.1 | MDVPRRHVDFGREGTMNKKEYTAPTLLSRGAFSQTS ^G GGIWWV ^E WVGKFN | 7 | II | Si | II |
| 35 | <i>Streptomyces flavidovirens</i> | WP_028815403.1 | MRTYERPTLTPMGSGFKV ^{TG} GRVKRTGPP ^D ILHRHRLVG | 10 | Ext | Si | II |
| 36 | <i>Streptomyces natalensis</i> | WP_030063942.1 | MQHEIENVHMEEPAVEPVTTSEYPPMVTEAGAF ^{AEV} TR ^G GGIGTFK ^E EAGVGRFM | 8 | II | Si | II |
| 37 | <i>Streptomyces aureocirculatus</i> | WP_030570746.1 | MSRASSSTARPVSESPETADALRDNLWVRIT ^R GRLRPEPNG ^E IRADRW | 10 | II | Si | II |
| 38 ^a | <i>Frankia sp. Thr</i> | EYT91560.1 | MKAIYLPRLLEDAGSFAAV ^{TN} GRWGWGR ^D YSWRRFA | 8 | II | Si | II |
| 39 ^a | <i>Frankia sp. Ccl6</i> | WP_023840807.1 | MKAIYLPRLLEDAGSFAAV ^{TN} GRWGWGR ^D YSWRRFA | 8 | II | Si | II |
| 40 | <i>Amycolatopsis lurida</i> | KFU76047.1 | MGVSYSFMALTFRRSFGSGVHAPSPNVTRGSPVPQRTKLPEPAIATS ^G TQGANEE ^P PRDRSQGRHR | 8 | II | Si | II |
| 41 ^a | <i>Streptomyces violaceusniger</i> | WP_014056406.1 | MSRRLSDVRLRYSPVCPSSSAGISAGSTPRASRKPRTATAG ^A RGSP ^E GSKPRRLM | 7 | II | Si | II |
| 42 | <i>Kitasatospora setae</i> | WP_014137215.1 | MQELTPLDGEPEGETVVLGDAALL ^{TK} GSSNNSV ^E GKRSPYDAG | 8 | III | Si | II |
| 43 | <i>Streptomyces canus</i> | WP_020123203.1 | MGNMGMNEETYETPELVEVGGFAEL ^{TL} GAGPTD ^{CV} DWWGGDAWIC | 9 | II | Si | III |
| 44 | <i>Actinoplanes sp. SE50/110</i> | WP_014687974.1 | MAPTTYQRPTLTKGGSFARKTAG ^S LF ^T SC ^R ESFVTQKPKAV ^{CN} | 9 | II | Si | III |
| 45 | <i>Nocardiosis alba</i> | WP_026124932.1 | MGAFSEV ^{TL} GRPNWGF ^E NDW ^{SC} VRVC | 8 | II | Si | II |
| 46 | <i>Streptomyces clavuligerus</i> | WP_003963074.1 | MAEQFTRTRPPGAADTQSAAPGTDSSPTLLALPESFPIEGST ^{LG} RLPNDDAD ^K SGAMYFT | 9 | II | Si | II |
| 47 | <i>Xylanimonas cellulosilytica</i> | YP_003324691.1 | MPSYAAPKLTRIGSFKTV ^{TK} SLGKAPHND ^I FRRPVAVFIYL | 9 | NC1 | No | II |
| 48 | <i>Streptomyces sp. NRRL F-6674</i> | WP_033224840.1 | MSATYEPALQEIGDFDEL ^{TK} CLGVG ^{SC} ND ^F AG ^C GYAIV ^{CFW} | 9 | NC1 | No | I |
| 49 | <i>Streptomyces sp. HK1</i> | WP_011436524.1 | MSPDCGHRYERPGEYPVIVTAHWNIWTAT ^G GDGGTLT ^E TRTTELVADLREAQVLNTR | 8 | NCC | No | II |
| 50 | <i>Frankia sp. Eul1c</i> | WP_013421451.1 | MKARYDTPMLDAAGEFSEV ^{TD} GRWGWGR ^D WLWRSFPRYGGGGGAIIVGGGGRRY | 8 | NCC | No | II |
| 51 | <i>Microlunatus phosphovorius</i> | WP_013865731.1 | MSESVQPRPQYESPRLTEVGSVKDL ^{TL} GEGIRGND ^D TFVFSIWGHQISISYGELS | 9 | NCC | No | II |
| 52 | <i>Mycobacterium sp. JDM601</i> | WP_013830564.1 | MQYSYPPQVVRVGDVDRDAT ^Q GSGNYLS ^D SSTGYGYMGWYSRHYDTPDTVAPLPPR | 8 | NCC | No | II |
| 53 | <i>Frankia symbiont of Datisca glomerata</i> | WP_013873707.1 | MKAPYQPPALQEVGTFPV ^{TE} GYGGHRR ^D YGGYQKFRFRFRFRGFRHG | 8 | NCC | No | II |
| 54 | <i>Streptomyces albus subsp. albus</i> | WP_030547855.1 | MGRFRGGRRPRRGEPPASRARFRPVPRARPGCH ^{TR} G ^S PARHRE ^E GSGAESVMRCPVNPIMIGS | 8 | NCC | No | II |
| 55 | <i>Streptomyces sp. NRRL S-476</i> | WP_030853726.2 | MKKAYEAPTLVRLGTFRK ^{KT} G ^F LQSSGND ^R LILSKN | 9 | NCT | No | II |
| 56 | <i>Streptomyces chartreusis</i> | WP_010042084.1 | MVSGVTRRALAASSRDRPAVCRASWRRRPRIMRRT ^V GAPAPVP ^D RASFTVPPEGSSPVQA | 8 | NCC | No | II |
| 57 | <i>Streptomyces albulus</i> | AIA02566.1 | MTGNPANPT ^{GG} QPW ^G ASV ^D SLGVSRRRLPCCLKGCPT ^R QWQNDCT | 9 | NCC | No | II |
| 58 | <i>Streptomyces auratus</i> | WP_006602541.1 | MTG ST SG ^S ESRRNHQ ^D TSSPTANRQGGAGRAQRA | 10 | NC2 | No | II |
| 59 | <i>Streptomyces auratus AGR0001</i> | EJJ08101.1 | MTG ST SG ^S ESRRNHQ ^D TSSPTANRQGGAGRAQRA | 10 | NC2 | No | II |
| 60 | <i>Streptomyces roseovorticillatus</i> | WP_030369934.1 | MSLPPSSRTVFFTS ^{PA} IATDRPAGSLPVRVAAAT ^L GSRRTPSTARE ^E PTSSVWKQPSGKPARNRSPR | 11 | NC2 | No | II |
| 61 | <i>Streptomyces katrae</i> | WP_030301601.1 | MDPDLSADNPDCPRPNCDFPDCGRTIGPAE ^I WEHRRNPSAG ^{TT} G ^T LPKETNT ^C ERS ^S LCS ^P SPQPRSPW | 10 | NC2 | No | III |

* Código asignado por NCBI.

1. Tamaño del anillo de macrolactama, incluyendo los aminoácidos que lo constituyen

2. Clado al cual pertenece **Figure 1**

a. Péptidos ya encontrados en otros trabajos Mikhail O. Maksimov et al. [1]

b. Lariatina [2].

NC1: Péptidos No canónicos : **NC1:** Gly¹ es remplazada por Ser or Cys; **NC2:** tamaño del anillo; **NCC:** tamaño del C-terminal

NCT: Posición de Thr; **Ext:** tamaño del anillo superior a 10 aminoácidos

TABLA S2

Rendimientos obtenidos en este trabajo.

| Strain | Yield μgL^{-1} |
|---|---------------------------|
| SRO15-2005 from endogenous expression | 5 \pm 3 |
| SRO15-2005 pNIC- <i>sroACB1B2D</i> | NN |
| SRO15-2005 pNIC- <i>sroArCB1B2D</i> | 70 \pm 8 |
| SRO15-2005 (pNIC- <i>sroACB1B2D</i> + betaine 1 mM) | 80 \pm 10 |
| R13L | 18 \pm 5 |
| R14L | 20 \pm 5 |
| K8L | 28.4 \pm 2 |
| R13L/ R14L | NN |
| K8L/ R13L | 15 \pm 5 |
| K8L/ R14L | 15 \pm 5 |
| K8L/R13L/ R14L | NN |

TABLA S3

Caracterización de la fragmentación del péptido Lasso SRO15-2005 y variantes.

a. MS² SRO15-2005 [M+2H]²⁺:1003.00

| Ion | Masa calculada | Masa Observada | Error |
|----------------------|----------------|----------------|--------|
| b9 | 1013.473 | 1013.51 | 0.0037 |
| b15 | 1874.934 | 1874.98 | 0.0023 |
| b14 | 1761.850 | 1761.94 | 0.0052 |
| b13 | 1605.749 | 1606.95 | 0.0748 |
| b12 | 1449.647 | 1450.01 | 0.0250 |
| b11-H ₂ O | 1344.604 | 1344.84 | 0.0175 |
| b10 | 1176.536 | 1176.54 | 0.0003 |

b. MS² SRO15-2005 R14L [M+2H]²⁺: 973.00

| Ion | Masa calculada | Masa Observada | Error |
|----------|----------------|----------------|--------|
| b9 | 1013.4727 | 1013.5643 | 0.0090 |
| b15 | 1831.9166 | 1831.9916 | 0.0041 |
| b14 | 1718.8326 | 1718.8443 | 0.0007 |
| b13 [2+] | 802.8743 | 802.9142 | 0.0050 |
| b12 | 1449.6474 | 1449.6797 | 0.0022 |
| b11 | 1362.6154 | 1362.6985 | 0.0061 |
| b10 | 1176.5361 | 1176.5881 | 0.0044 |

c. MS² SRO15-2005 K8L [M+2H]²⁺: 987.00

| Ion | Masa calculada | Masa Observada | Error |
|----------|----------------|----------------|--------|
| b9 | 1013.4727 | 1013.5643 | 0.0090 |
| b15 | 1831.9166 | 1831.9916 | 0.0041 |
| b14 | 1718.8326 | 1718.8443 | 0.0007 |
| b13 [2+] | 802.8743 | 802.9142 | 0.0050 |
| b12 | 1449.6474 | 1449.6797 | 0.0022 |
| b11 | 1362.6154 | 1362.6985 | 0.0061 |
| b10 | 1176.5361 | 1176.5881 | 0.0044 |

d. MS² SRO15-2005 K8L R13L [M+2H]²⁺: 965.00

| Ion | Masa calculada | Masa Obervada | Error |
|-----------------|----------------|---------------|---------|
| b9 | 998.462 | 998.490 | 0.00287 |
| b15[2+] | 908.453 | 908.549 | 0.01054 |
| b14 | 1703.822 | 1703.847 | 0.00150 |
| b13 | 1547.721 | 1547.728 | 0.00051 |
| b12 | 1434.636 | 1434.639 | 0.00020 |
| b11 | 1347.604 | 1347.679 | 0.00553 |
| b10 [2+] | 580.763 | 580.773 | 0.00171 |

TABLA S4

Análisis térmico del péptido SRO15-2005 y sus variantes. Los datos muestran que los picos obtenidos por HPLC con la misma masa tienen diferentes tiempos de retención luego de ser expuestos al tratamiento térmico.

| Strain | A. SRO15-2005 | | B. R14L | | | C. R13L | |
|--------|---------------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Tiempo de Retención +/- 0.1 min | | | | | | |
| Hours | Peack (19.69) | Peack (20.82) | Pe. (19.92) | Pe. (20.72) | Pe. (21.83) | Pe. (19.92) | Pe. (22.60) |
| 1 | 19.72 | 20.91 | 20.01 | 20.58 | 21.85 | 19.92 | 20.61 |
| 2 | 19.74 | 20.93 | 21.81 | 20.57 | 21.86 | 19.94 | 20.63 |
| 3 | 19.65 | 20.82 | 21.81 | 20.63 | 21.95 | 20.75 | 20.62 |
| 5 | 20.76 | 20.87 | 21.62 | 20.74 | 21.81 | 20.66 | 20.67 |
| 7 | 20.85 | 20.83 | 21.87 | 20.78 | 21.73 | 20.65 | 20.63 |

| Strain | D. K8L | E. K8L /R14L | | | F. K8/L R13/L | | |
|--------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Tiempo de Retención +/- 0.1 min | | | | | | |
| Hours | Pe. (25.28) | Pe. (25.03) | Pe. (25.71) | Pe. (26.62) | Pe. (25.53) | Pe. (25.78) | Pe. (26.91) |
| 1 | 25.36 | 25.09 | 25.81 | 26.68 | 25.55 | 25.79 | 27 |
| 2 | 25.33 | 26.69 | 25.75 | 26.71 | 26.94 | 25.83 | 26.97 |
| 3 | 26.32 | 26.68 | 25.77 | 26.73 | 26.95 | 25.78 | 26.92 |
| 5 | 26.37 | 26.64 | 25.81 | 26.67 | 27.01 | 25.82 | 26.94 |
| 7 | 26.31 | 26.64 | 25.72 | 26.62 | 26.97 | 25.88 | 26.97 |

Tabla S5. Comparación de las características del SRO15-2205 con péptidos similares como: astexin-1, capistruin, and RES-701-1

| | Total de Residuos | Tamaño Anillo | Tamaño C-Terminal | Tamaño Del loop | Numero De residuos abajo del anillo | Residuo Que Participa Enlace Del anillo | Residuo Que Participa Enlace Del anillo | residuo Estabilización |
|------------|-------------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------|---|---|------------------------|
| astexin-1 | 23 a.a | 9 a.a | 14 a.a | 8 a.a | 6 a.a | Asp9 | Glu6 | Arg18 |
| capistruin | 19 a.a | 9 a.a | 10 a.a | 5 a.a | 5 a.a | Asp9 | Arg11 | Arg15 |
| RES-701-1 | 16 a.a | 9 a.a | 7 a.a | 4 a.a | 3 a.a | Asp9 | Phe12 | Tyr14 |
| SRO15-2005 | 16 a.a | 9 a.a | 7a.a | 4 a.a | 3 a.a | Glu9 | Arg13 | Arg14 |

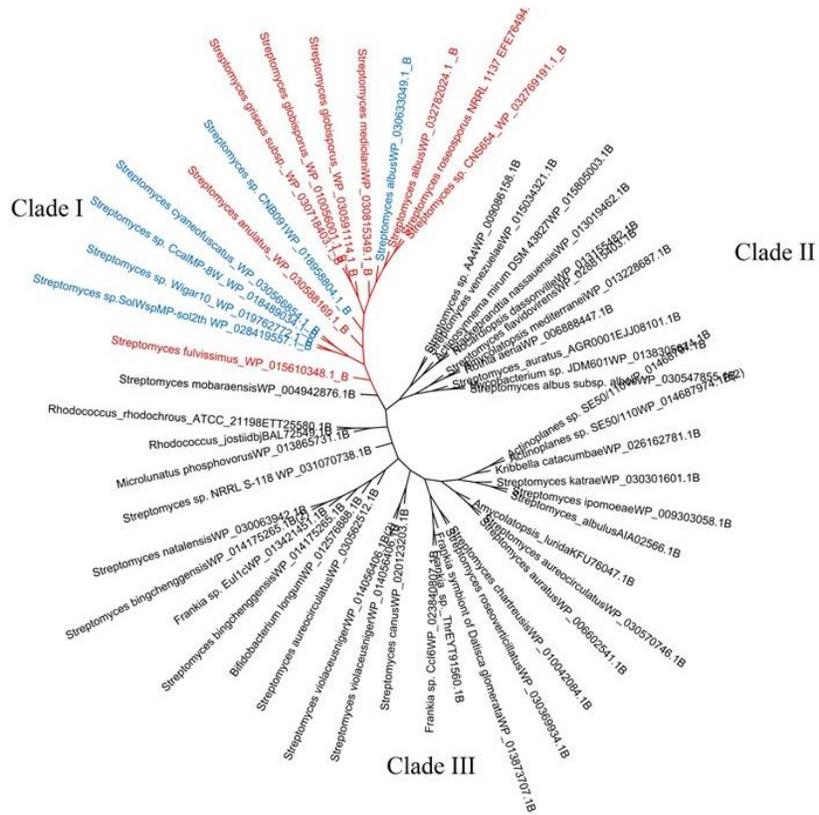


Figura S3. Árbol filogenético para las proteínas codificadas para el gen C. Clade en rojo contiene las mismas proteínas que el clado I del árbol concatenado

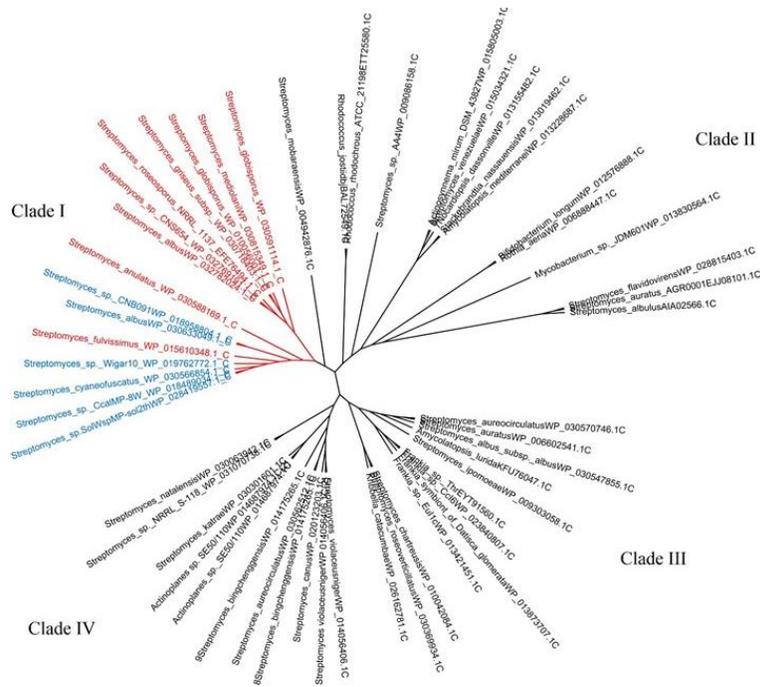


Figura S4. Estudio de Motivos conservados para las proteínas codificadas por los genes B. Los motivos fueron obtenidos con el algoritmo MEME. El color rojo representa el motive 1; verde motive 2; azul motivo 3.

Motivo1.

Motivo2.



Motivo 3



| Name | p-value | Motif Location |
|--|----------|---|
| 1. B_longum_WP_012576888.1b | 1.89e-30 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 3. A_taxon_WP_009198024.1b | 2.48e-22 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 4. S_nassauensis_WP_013019462.1b | 6.93e-21 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 5. S_roseosporus_EFE76494.1b | 9.96e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 6. N_dassonville_WP_013155482.1b | 1.15e-15 | [Motif 3] |
| 7. S_bingchenggensis_YP_004960922.1b | 5.57e-41 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 8. S_bingchenggensis_YP_004960924.1b | 5.13e-35 | [Motif 3] [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 9. Streptomyces_AA4_WP_009086158.1b | 6.80e-4 | [Motif 3] |
| 10. S_venezuelae_WP_015034321.1b | 6.60e-4 | [Motif 3] |
| 11. A_mediterranei_WP_013228687.1b | 1.31e-17 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 12. Actinoplanes_WP_014687974.1b | 2.71e-33 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 13. R_jostii_dbjBAL72549.1b | 1.48e-31 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 14. R_aeria_WP_006888447.1b | 1.64e-26 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 15. R_aeria_WP_006888447.1b_b | 1.64e-26 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 16. S_fulvissimus_WP_015610348.1b | 7.84e-57 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 17. S_albus_WP_032782024.1b | 1.08e-58 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 18. S_CNS654_WP_032769191.1b | 1.08e-58 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 19. S_griseus_WP_030718403.1b | 1.28e-56 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 20. S_globisporus_WP_010056001.1b | 3.59e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 21. S_anulatus_WP_030588169.1b | 1.06e-58 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 22. S_globisporus_WP_030591114.1b | 4.09e-53 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 23. S_mediolani_WP_030815349.1b | 6.52e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 24. S_albus_WP_030633049.1b | 1.38e-53 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 25. S_SolWspMP_WP_028419557.1b | 3.00e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 26. S_CcalMP-8W_WP_018489034.1b | 3.00e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 27. S_cyaneofuscatus_WP_030566854.1b | 1.24e-57 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 28. S_CNB091_WP_018958804.1b | 9.12e-54 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 29. S_Wigar10_WP_019762772.1b | 5.38e-59 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 30. S_alboviridis_WP_032758827.1b | 8.00e-57 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 31. S_mobaraensis_WP_004942876.1b | 3.90e-45 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 32. S_NRRLS_118_WP_031070738.1b | 2.27e-43 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 33. K_catacumbae_WP_026162781.1b | 1.30e-37 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 34. S_aureocirculatus_WP_030562512.1b | 2.06e-44 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 35. R_rhodochrous_ETT25580.1b | 3.43e-30 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 38. S_aureocirculatus_WP_030570746.1b | 5.57e-40 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 39. Frankia_EYT91560.1b | 2.48e-38 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 40. Frankia_Cc16_WP_023840807.1b | 2.78e-38 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 41. A_lurida_KFU76047.1b | 1.44e-37 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 42. S_violaceusniger_WP_014056406.1b | 1.12e-44 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 43. S_violaceusniger_WP_014056406.1b_b | 1.12e-44 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 44. K_setae_WP_014137215.1b | 3.24e-5 | [Motif 3] |
| 45. S_canus_WP_020123203.1b | 1.50e-40 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 46. S_katrae_WP_030301601.1b | 5.17e-32 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |
| 47. N_alba WP_026124932.1b | 2.72e-39 | [Motif 1] [Motif 2] [Motif 3] |

Figura S5

Estudio de Motivos conservados para las proteínas codificadas por los genes C. Los motivos fueron obtenidos con el algoritmo MEME. El color rojo representa el motivo 1; verde motivo 2; azul motivo 3.

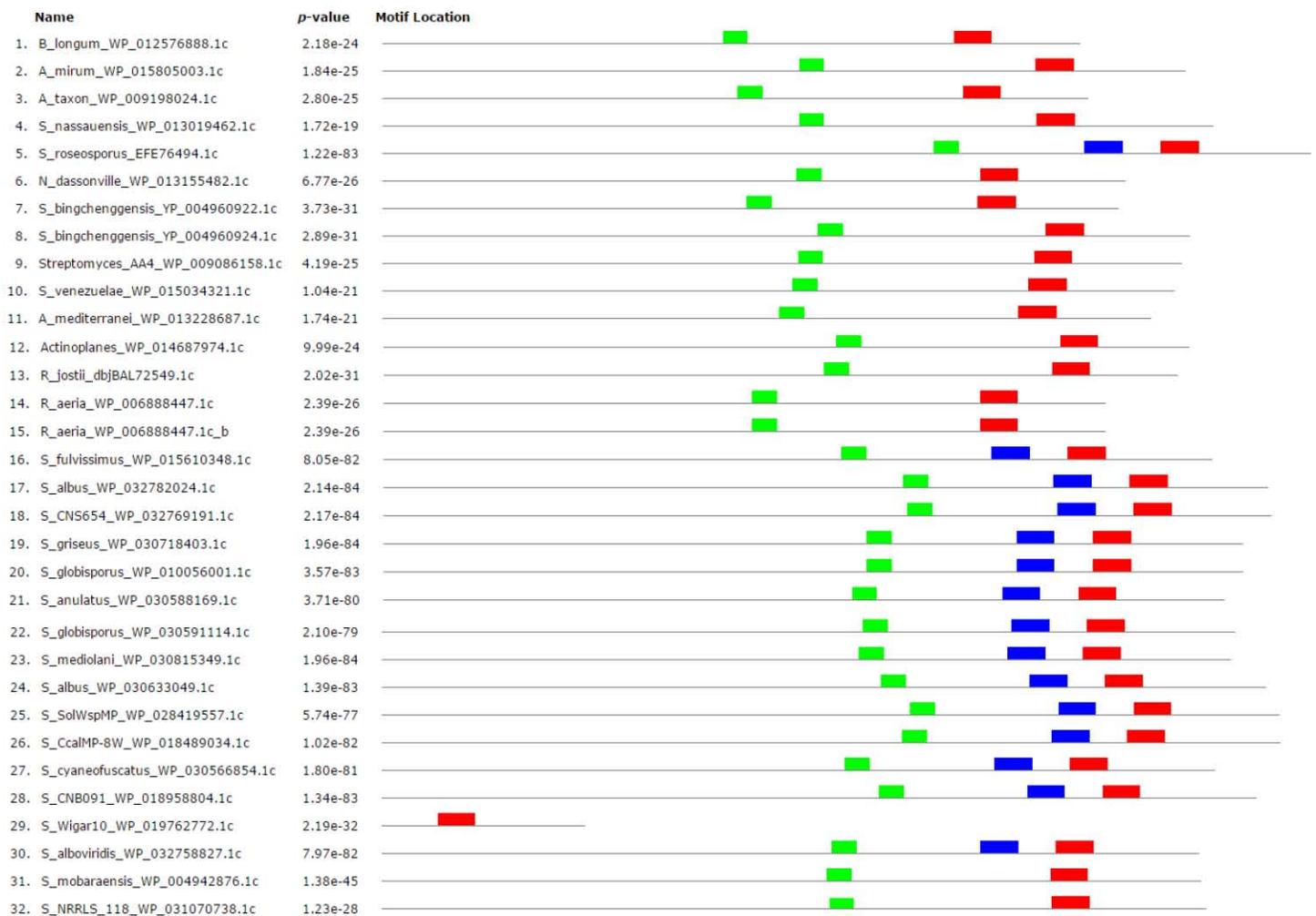
Motif 3.



Motif 2*.



Motif 1



* Motivos característicos de proteínas C del caldo I

Figura S7. Comparación de los parámetros de orden para los diferentes modelos CM1 a CM2 (negro 300K, rojo 325K y verde 350K)

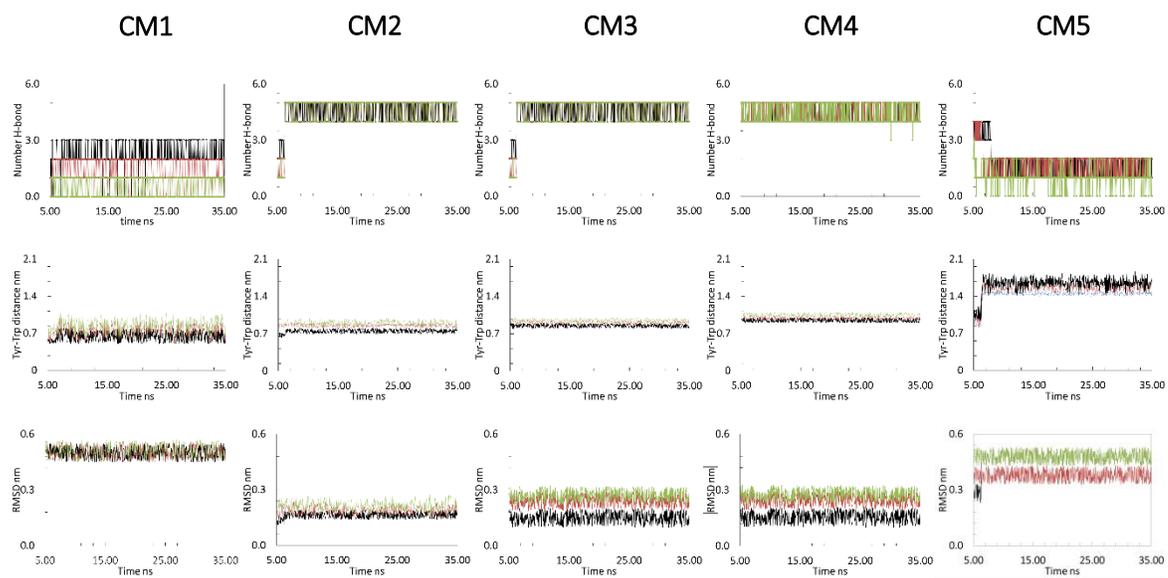
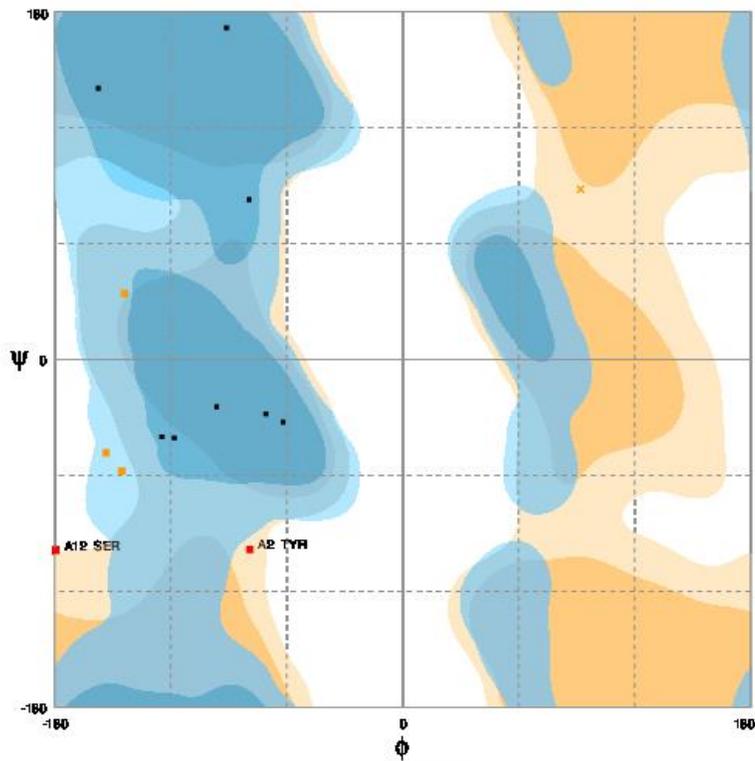


Figure S8. Diagrama de Ramachandran para el modelo CM1



Bibliografia

1. Timothy L. Bailey and Charles Elkan, "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.
2. 15. Accelrys Discovery Studio. [Accessed on December 2013]. Available online: <http://accelrys.com/products/discovery-studio>
3. Accelrys Discovery Studio. [Accessed on December 2013]. Available online: <http://accelrys.com/products/discovery-studio>.

Structural Analysis As an Alternative to Identify and Determine Mode of Action of Antimicrobial Peptides: Proposition of a Kinetic Model Based on Molecular Dynamics Studies

Edson Edinho Robles-Gomez¹, Mirelle Citlali Flores-Villegas², Alicia González-Manjarrez³ and Manuel Soriano-García*

¹Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04360, México; ²Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04360, México; ³Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04360, México; ⁴Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04360, México

Abstract: Antimicrobial peptides (AMPs) constitute an important alternative in the search for new treatments against pathogens. We analyzed the sequence variability in cytokine and chemokine proteins to investigate whether these molecules contain a sequence useful in the development of new AMPs. Cluster analysis allowed the identification of tracts, grouped in five categories showing structure and sequence homology. The structure and function relationship among these groups, was analyzed using physicochemical parameters such as length, sequence, charge, hydrophobicity and helicity, which allowed the selection of a candidate that could constitute an AMP. This peptide comprises the C-terminal alpha-helix of chemokines CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰. Far-UV CD spectroscopy showed that this molecule adopts a random conformation in aqueous solution and the addition of 2, 2, 2 trifluoroethanol (TFE) is required to induce a helical secondary structure. The CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide was found to have antimicrobial activity and very limited hemolytic activity. The mechanism of action was analyzed using model kinetics and molecular dynamics. The kinetic model led to a reasonable assumption about a rate constant and regulatory step on its mechanism of action. Using molecular dynamics simulations, the structural properties the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ have been examined in a membrane environment. Our results show that this peptide has a strong preference for binding to the lipid head groups, consequently, increasing the surface density and decreasing the lateral mobility of the lipids alters its functionality.

Keywords: Antimicrobial peptide, cluster analysis, kinetic model, molecular simulation, Sequence Analysis, Scanning Electron Microscope.

1. INTRODUCTION

The natural antimicrobial peptides (AMPs) are cationic molecules present in the immune systems of many animals, insects, and plants [1,3]. The fact that the irrational use of antibiotics has led to the emergence of resistant strains of pathogenic microorganisms [4], AMPs have recently emerged as promising candidates against drug-resistant pathogens [5]. Many efforts have been directed to develop natural AMPs, the main problems to solve is the fact that these molecules are hemolytic and expensive to produce [6].

Recent studies have been directed to design cationic antimicrobial peptides using random sequences including arginine and tryptophan, because these residues have been

proven to be very important in antimicrobial activity [7]. However, progress has been slowed by the fact that the fundamental relationship between sequence-structure-mechanism of action is not readily understood in the classic terms [8]. Here, we explored the physicochemical properties of their antimicrobial activity, performed sequence analysis, and it was proposed a novel approach to identify a new AMP candidate.

The immune system is very complex, since it is constituted by several types of proteins that have different functions against pathogens [9]. We considered that proteins in the immune system may contain motifs with antimicrobial activity. Here, we undertook a comparative approach using available sequences from cytokines and chemokines and evaluated the relationship between structure-function and physicochemical parameters of the candidates to constitute AMPs [10,11].

When the microorganisms are exposed to AMPs, the adsorption onto the membrane surface constitutes the first

*Address correspondence to this author at the Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04360, México; Tel: (52) (55) 56-22-45-69; Fax: ??????????; E-mail: soriano@servidor.unam.mx

step of the interaction, followed by permeation, positioning, and destabilization of the membrane. These events are frequently followed by total destruction of the cell morphology [12]. The membrane permeabilizing activity of AMPs is frequently investigated in a synthetic bilayer vesicle system which is more convenient for experimental studies addressing structure-function studies [13,14]. However, since the correlation between antimicrobial activity and model membrane-permeabilizing activity is complex, we explored the adsorption of a peptide on a membrane because, it is a key step of the process. In general, the surface-protein interactions are largely dependent on electrostatic forces [15]. Fundamental understanding of the peptide dynamics on the membrane surface is however, still lacking. The dynamic behavior of the peptide in the interface is explicitly shown in a kinetic model that we developed in this study: where the rate constant k_f is related to the total gain in the structural active state of the peptide due to transitions from other states.

Peptide insertion and positioning in membrane hosts are of particular interest in AMPs. For example, some AMPs do not readily permeabilize synthetic membranes or require higher concentrations to do so [16]. Furthermore, it is generally accepted and experimentally verified that the insertion of charged residues into the lipid bilayer is thermodynamically unfavorable [17]. However, the simplest models of membrane permeation involve the formation of trans-membrane pores. An illustrative one is the lytic peptide toxin melittin pore-forming, although this example is actually an exception [18]. Other models have described the AMP activity in terms of binding, insertion, and perturbation using thermodynamic models [19], which is the most widely accepted mechanism to explain this process.

Computational approaches are also being used to expose the details of peptide insertion and positioning [20]. Computational methods like molecular dynamics (MD) have complemented experimental techniques. In the implicit membrane approach, the membranes are well characterized by many experimental techniques as well as numerous MD simulations [21,22]. We have carried out a number of simulations of this system; the trajectories were analyzed with respect to specific lipid properties and to peptide-lipid interaction that constitute important steps towards finding the peptide mode of action.

In this work, we explored the nature of the physico-chemical properties of the AMPs, the sequence analyses of cytokine and chemokine proteins, and we found that the C-terminal domain of Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) is a candidate to display antimicrobial activity. This peptide has an important antimicrobial activity, with very limited hemolytic activity. This finding provides a new tool for the discovery of novel AMPs, although further studies were conducted on the dynamics of peptide adsorption [23], in order to understand the peptide dynamic process at the membrane surface. We present a simulation of a solvated peptide-membrane system, the membrane of choice is a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer. While the experimental data helped to validate the simulation, the latter will provide detailed information at the atomic-level. Molecular dynamics studies showed the preference of binding of the lysine to headgroups of negatively charged phospholipids, a decrease

in the lateral mobility of such lipids in the membrane and the consequent alteration of their functionality. The results of molecular dynamics, experimental assays indicate that their action mechanism implicates a perturbation of membrane environment. We propose a kinetic model that includes the membrane-peptide interaction with a limiting step and a variable membrane parameter, which complements the results presented in this work and validates the action model.

2. MATERIALS AND METHODS

The synthetic peptide CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ was obtained at >95% purity from Anspec Inc. However, an extra purification was done by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Hibar Purospher Star RP-18e 5 mm (Merck). The molecular mass was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (MS; Bruker).

2.1. Sequence Analyses

We included 380 proteins from the PDB (Protein Data Bank) database with structures determined by X-ray diffraction or NMR into the studied group. These proteins were selected and filtered using the following criteria: The organism was *Homo sapiens*, expressed in *Escherichia coli* to prevent the presence of post-translational changes, and a molecular weight less than 180 kDa. We eventually worked with a total of 48 proteins between cytokines and chemokines. Multiple alignments were performed in ClustalW [24] with a BLOSUM matrix [25]. The phylogenetic tree was obtained using the NJ method from the BLOSUM62 [26] substitution and WAG model, where distances were measured. The robustness of the trees obtained was tested by bootstrap procedure [27] with 100 repetitions and TOPD/FMTS to compare dendrograms [28]. The final dendrogram was composed of 17 proteins between chemokines and cytokines.

2.2. CD Spectroscopy

To get an insight into the molecular structure of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide, CD spectroscopy technique was employed in the range of 180-260 nm. The spectra of each sample were recorded on a J-720 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo; Japan) at scanning of 10 nm/min, 0.5 nm resolution. The measurements were performed at 37 °C in a 10 mm quartz cuvette with a peptide concentration of 0.30 mg/mL. The peptide was used in each sample using water with different concentrations of TFE %v/v, going from 10% to 60% of TFE with subsequent 10% increments, and M9 medium. The alpha-helical content was analyzed using SELCOM 3 program [29].

2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Exponential phase cultures of *E. coli* cells and *S. cerevisiae* and *C. glabrata* (18 h old) were incubated with the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide (600 µg/mL) at 37 °C for 24 h. After centrifugation for 30 min at 3000 ×g (4 °C), the resulting pellet was washed twice with sterile water, and then resuspended in 3.0% glutaraldehyde for 18 h at ambient temperature. Subsequently, the solution dehydrated in a graded series of ethanol solutions. After critical-point drying and

layering with 20 nm gold coating, the microscopy was performed with an scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan). Cells suspension of *E. coli* without the addition of peptide was treated as the control.

2.4. Bactericidal Assays and Growth Curves

A slight modification of the standard colony-forming assay was used to test for the antimicrobial activity of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ against *E. coli*, *S. cerevisiae*, and *C. glabrata*. Briefly, the cells were grown at 37 °C in adequate culture medium (*E. coli*: M9 minimal media, and yeasts: YPD medium), to mid log phase, optical density OD_{600nm} = 0.05. The cells were then incubated with the peptide in a 96 well polypropylene Microtiter plate for 24 h at 37 °C with shaking. The OD measure at 600nm was recorded on a Bio-ScreenC Tipe FMPOOC, The peptide was diluted to concentrations ranging from 0.8 to 0.2 mg/mL in culture medium to a final volume of 180 µL. 20 µL of the cells were then added into each well. The cells were incubated with the peptide in 96 well plates for 30 minutes at 37 °C with shaking following the incubation, 20 µL of the samples were spread on MH plates (30.0% beef infusion, 1.75% casein hydrolysate, 0.15% starch, 1.7% agar). After incubation of the plates at 37 °C for 12-20 h, bacteria were counted as colony forming units/mL.

2.5. Hemolytic Assays

Hemolytic activity was tested using red blood cells as previously described [30,31]. Blood was centrifuged at 700 g and 4 °C for 5 minutes, removing the supernatant and replacing it 5 times with Alsever's anticoagulant solution (glucose 20.5 g/L, sodium citrate dihydrate 8.0 g/L, citric acid monohydrate 0.55 g/L and 4.2 g sodium chloride). A series of peptide solutions were prepared in a polypropylene plate (Costar, Cambridge, USA) with 40 µL of cell suspension and Alsever solution to a maximum volume of 300 µL. A well containing milli-Q water without peptide plus erythrocytes was used as positive control and another one with Alsever solution and erythrocytes as a negative control. The mixtures were incubated at 37 °C for 30 minutes and then centrifuged at 700 g for 5 minutes. The absorbance of the supernatant was measured at 408 nm. The percentage of hemolysis is reported and the experiments were performed in triplicate and validated by *t*-test.

2.6. Calcein Leakage

Large unilamellar vesicles (LUVs) composed of a 2:3:1 ratio of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and cholesterol (Ch) (SIGMA), respectively, Representing the membranes of mammals. LUVs were prepared by extraction. A stock solution of the various phospholipids in chloroform at a concentration of 10 mg/ml was prepared. 0.5 g of stock solution were diluted in chloroform, evaporated in a stream of nitrogen for 2 hours to remove all the chloroform, hydrated it in 3.5 ml of a solution containing 30 mM calcein, 10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl at pH 7.4. The sample was incubated for a period of 2 hours, with heating and cooling cycles in continuous agitation. Finally we processed the sample through an extruder with a polycarbonate filter of 0.22 µm for more than 10 times. The non-trapped calcein was

separated by molecular exclusion chromatography on a Sephadex-G25 column. The fluorescence of calcein in the medium was recorded on a Biotek SynergyMx. The fluorescence intensity was measured at 520 nm (490 nm excitation). The peptide was diluted to concentrations ranging from 0.8 mg at 0.3 mg/mL in the wells of a Microtiter fluorescence microplate (Costar, Cambridge). The maximum fluorescence was determined by destroying the vesicles with 10% Triton X100 detergent as a positive control. The percentage of calcein was calculated according to the following equation:

$$\% L = 100 * \frac{F - F_o}{F_{max} - F_o} \quad (9)$$

Where F_o is the fluorescence of the intact vesicles solution, F and F_{max} are the fluorescence observed in the samples obtained by adding Triton X100, respectively. The experiment was monitored every 45 seconds, maintaining the temperature at 25 °C for 30 minutes. The experimental uncertainty was estimated to +/- 5% of the measured value.

2.7. Determination of Adsorption Model and Application of Kinetic Model

The peptide was diluted to concentrations ranging from 0.8 mg to 0.2 mg/mL in each well with a constant amount of blood cells [30]. The mixtures were incubated for 40 minutes and centrifuged at 700 × g at 4°C for 5 minutes. The decrease of the peptide concentration in solution was monitored by the absorbance of the tyrosine present in the medium in the NanoDrop 2000 Spectrophotometer. The kinetic model follows the previous methodology. However, the decrease in peptide concentration in solution was monitored for 30 minutes and the absorbance was recorded every 30 seconds.

2.8. Molecular Dynamics

The secondary structure of the peptide CXCL4/PF4⁵⁷⁻⁷⁰ (APLYKKIHKLLLES) which corresponds to the C-terminal region of the protein CXCL4/PF4 (PDB ID: 1F9R) was obtained from the PDB database for X-ray diffraction at 2.0 Å resolution. Using the GROMACS [32] program, the peptide was placed in a 22 nm³ box of and solvated with 4200 water molecules. The peptide was fixed at the center of the box and the water molecules were energetically minimized by a gradient. The peptide was then unrestrained and the whole system was minimized by the same protocol. The system was heated to 310 K in a 50 ps period. We then included the coupling of pressure and the system was equilibrated for 2 ns. Afterwards the final configuration reached by the system was used to start the membrane/peptide simulation. A pre-equilibrated membrane formed by 128-lipids of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was obtained from the Tieleman laboratory [33]. The membrane was equilibrated for 6 ns at a temperature of 310 K to see if there were changes in the density of the membrane or lateral displacement of the lipid. Using the program VMD [34], the latest configuration of peptide was placed on the membrane at a distance of 1.2 nm from the lipid head groups, in the center of it. The system (peptide/membrane/water) was placed in a 6.02 x 6.02 x 9.5 nm box and then solvated with water (28632 atoms). All the

simulation was carried out with a time interval of 2 fs, along periodic boundary conditions. The Lennard-Jones interactions were parameterized to a cutting radius of 1.0/1.4 nm. Electrostatic interactions were modeled by the Ewald method [35]. The system was allowed to equilibrate with a gradient minimization, until a force equal to or less than $850 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, was observed when the solvent is heated. Finally, all restraints were removed, and molecular simulation was conducted for a period of 75 ns. The Grom53A6 force field [32] was used for the peptide, which includes the water parameters. The temperature remained constant using the Nosé-Hoover thermostat. For the simulation we used a semi-isotropic (uniform in the vectors x, y and z independent) pressure scheme (Parinello-Rahman). All calculations were performed on the supercomputer KanBalam, UNAM.

3. RESULTS

3.1. Peptide Design

Multiple sequence alignment is a powerful tool to study the relations of taxa at all levels [36]. A total of 17 cytokines and chemokines were clustered according to amino acid sequence and secondary structure. The proteins were grouped into a dendrogram (Fig. 1A). Five groups were identified, namely G1 to G5, each group with high sequence and secondary structure similarity. G3 group was the most diverse group in its secondary structure. G3 is composed of cytokines of the TNF superfamily and Interleukin-1. Due to G3 high divergence of G3, a conserved sequence to be analyzed as a possible AMP could not be found. The G2 group has sequences with a common pattern at the N-terminus, PDGY-TAXYCXGEC (Fig. 1B), which was recognized to play a significant role in the interaction with heparinic sites in the extracellular matrix, thus, the sequence was discarded as a possible AMP candidate. Group G4 is composed of chemokines (CXC), the alignment revealed a close relationship of these proteins in terms of their sequences. The chemokines are a group of small proteins with molecular weights between 5 to 20 kDa, with an important role in both innate and adaptive immunity. Reported experimental data show that the C-terminal region of highly-charged positive amino acids is essential for their antimicrobial activity [3]. The most common sequence in the C-terminal domain is APXIKKIIKKXLX, with an alpha-helix as secondary structure (Fig. 1C). G5 is composed of CC chemokines, and shows no obvious pattern in charge clustering at the C-terminal domain. G1 is composed of chemokines having a positive surface charge clustered along the first and second β -strands and an α -helix displaying predominantly negative surface charge at the C-terminal domain. The highly positively-charged amino acids favors the interaction with the negatively charged groups on the surface of microbial and mammalian membranes [3]. The sequence of the C-terminus of G4 was selected as a sequence model in the search for a new AMP.

The sequences and physicochemical parameters of AMPs, such as their charge, helicity, hydrophobic moment and self-association were analyzed and compared (Table 1). There is a strong correlation between peptide cationicity and antimicrobial activity. This result agrees with previously

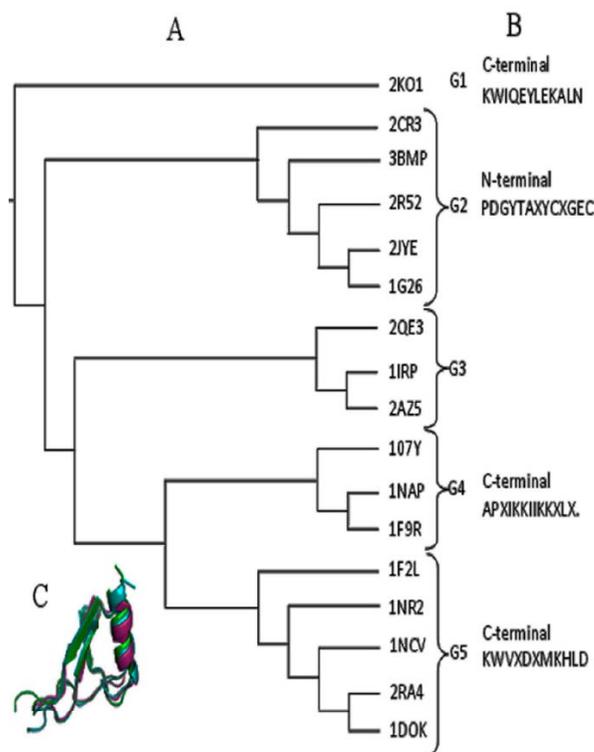


Figure 1. A) Final sequences dendrogram analysis of proteins of chemokines and cytokines, this describes the protein groups: G1: [2K01], G2: [2CR3, 3BMP, 2R52, 2JYE, 1G26], G3: [2QE3, 1IRP, 2AZ5], G4: [1O7Y, 1NAP, 1F9R], G5: [1F2L, 1NR2, 1NCV, 1RA4, 1DOK]. The scale bar represents 5 groups. B) Amino acid sequence of the N-terminal and C-terminal represent the common pattern within each group. C) The secondary structure of the G4 is showed because it is the selected group.

reported studies [5]. However, there is a limit beyond which the increasing positive charge does not increase their antimicrobial activity and increases their hemolytic activity [10]. The charge of G5 peptides is between +4 and +2 (Table 1). The predicted α -helical content [37] (Table 1) in the C-terminus region is consistently low, however, some peptides are known to require a membranous environment to fold into α -helices [38]. The increment in the hydrophobic moment results in a significant increase in the permeabilizing effect of membranes and an increment in antimicrobial activities. Therefore, a peptide with a high hydrophobic moment and low hydrophobicity would be suitable. Based on the above considerations, the C-terminal of 1F9R protein (CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰) was selected as the best candidate for an antimicrobial agent.

3.2. Circular Dichroism Spectroscopy (CD)

The conformation of the peptide was assessed by CD. As shown in (Fig. 2A) the CD spectra in aqueous solution shows a random structure conformation, with a minimum below 200 nm, in agreement with the prediction obtained from AGADIR software [37]. TFE is often used to improve the α -helical tendency of peptides. However, TFE can fold the peptide in a different pathway similar to that found inside

Table 1. Physicochemical Properties the C-terminal of G4 Group (% Helicity*, Charge, ISOELECTRIC POINT†, Hydrophobic moment‡)

| G4 | Sequence | % Helicity* | Charge | Hydrophobic Moment‡ |
|-------|-----------------|-------------|---------------|---------------------|
| I07Y | ESKAIKNLLKAVS | 0.71 (High) | +2.0 (Low) | 0.36 (High) |
| I1NAP | APRIKKIVQKKLAGD | 0.12 (Low) | +4.0 (High) | 0.20 (Low) |
| I1F9R | APLYKKIHKLLLES | 0.12 (Low) | +3.0 (Medium) | 0.34 (High) |

* Predicted by AGADIR (37)

† Based in Eisenberg scale

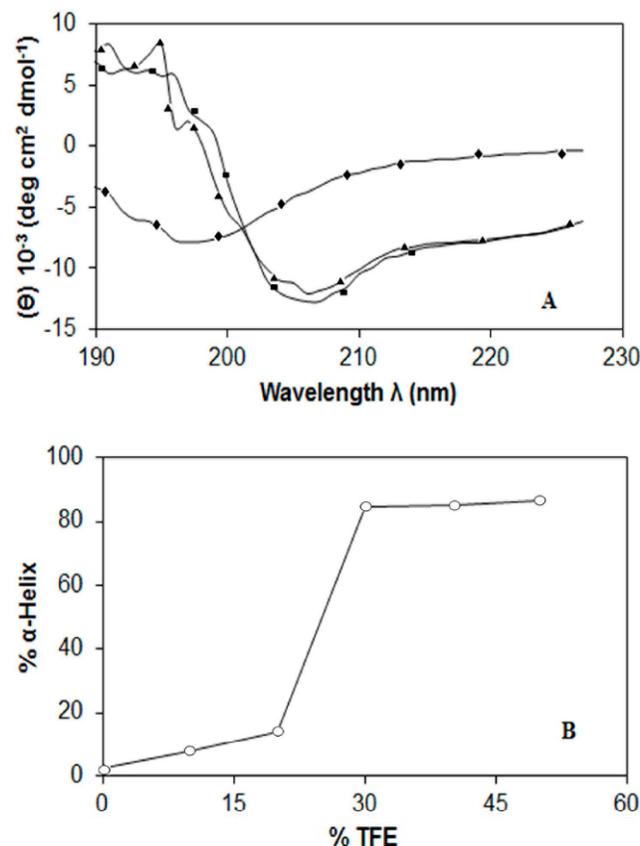


Figure 2. Far-UV circular dichroism spectra of the C-terminal of 1F9R peptide (CXCL4/PF-457-70). **A)** CD spectra of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ measured in: (diamond) water, (triangle) 60 % of TFE, (square) M9 medium. **B)** % α -helicity of peptide CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ at various concentration of TFE estimated by SELCOM 3 program (29).

the membrane environment [39]. By increasing the concentration of TFE the ellipticity of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ is increased (Fig. 2B). Surprisingly, the amount of helical structure of this peptide is increased in the presence of M9 culture medium for *E. coli* (Fig. 2A). It is generally understood that helical structure is stabilized by hydrophobic interaction combined with H-bonds and electrostatic interactions. We consider that the interaction of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions present in M9 medium with the water molecules allowed the proper folding of the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide.

3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

In the control group a normal surface of *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. Glabrata* can be shown and without apparent cellular debris (Fig. 3A, 3C, 3E). After treatment with a peptide, a variety of morphological changes were visualized in *E. coli* and *C. cerevisiae* and *C. glabrata* (Fig. 3B, 3D 3F). In yeast, we found a numerous lysed cells and cell debris were observed.

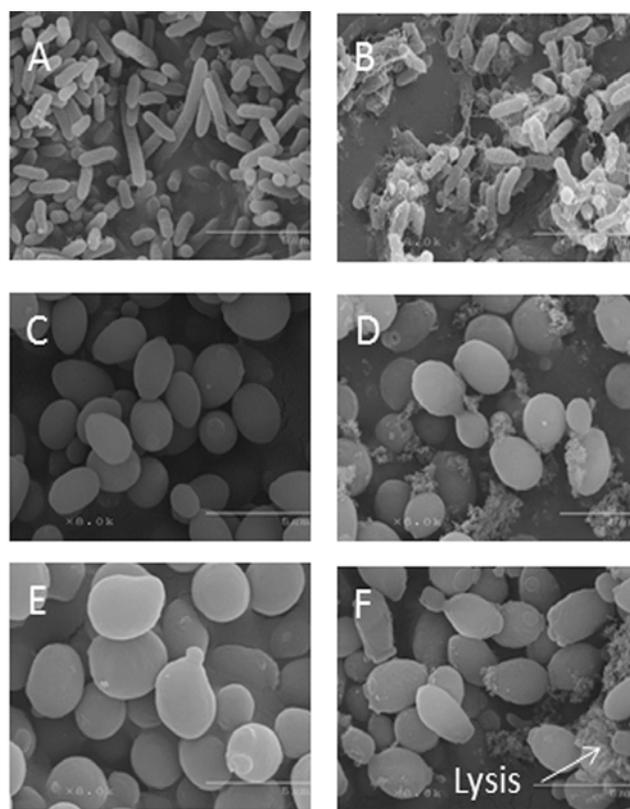


Figure 3. Scanning electron microscopy of *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. glabrata* treated with CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ (A, C, E) Control, absence of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ for *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. glabrata* respectively ; (B, D, F) treatments, presence of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰. Bars in figure represented 5 μ m. Morphological changes we visualized in *E. Coli*, and lysed cells and cell debris were observed in yeasts.

3.3. Biological Activities and Hemolytic Activity

The antimicrobial activity was shown to affect bacteria and yeasts (Fig. 4A - C). It had a bacteriostatic effect for *E. coli* cultures (Fig. 4A) and it showed a temporal growth-inhibitory effect on *S. cerevisiae* cultures (Fig. 4B). However it had an important effect on *C. glabrata* viability. (Fig. 4C and D). The different levels of activity could be mainly attributed to different membrane composition and a variety of other factors. The hemolytic activity of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ was very low in agreement with the predictions made from physicochemical parameters (Fig. 5A).

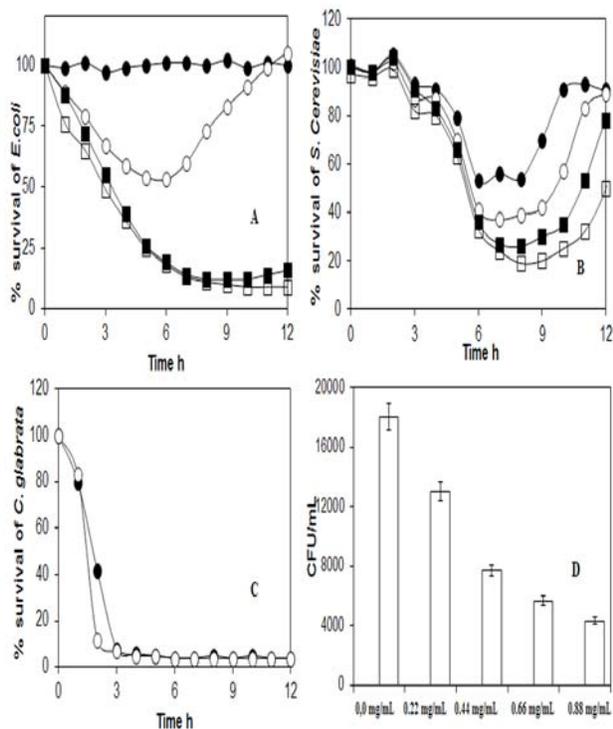


Figure 4. Survival and biological activity of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide., (presented as %) Dashed Lines (-●-) 0.22 mg/mL of peptide. (-○-) 0.44 mg/mL of peptide. (-■-) 0.66 mg/mL of peptide. (-□-) 0.88 mg/mL of peptide. **A)** % of survival of *E. coli* vs time. **B)** survival of *S. cerevisiae* vs time. **C)** % of survival of *C. glabrata* in the presence of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰. **D)** Antimicrobial activity of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ in *C. glabrata*.

3.4. Calcein Leakage Assays

The molecular disruption of the membrane caused by the antimicrobial peptide was assayed by fluorescence signal studies; in this case, the peptide was not able to induce calcein leakage from LUV composed of phospholipids (Fig. 5B). This suggests that the peptide would selectively damage bacterial and yeast membranes and not mammalian membranes. Furthermore, this result is in agreement with the result of its hemolytic activity.

3.5. Molecular Dynamics

During the first 4 ns of the experiment, the peptide diffuses and associates with the membrane. The peptide spends the remaining 70 ns undergoing structural changes in the

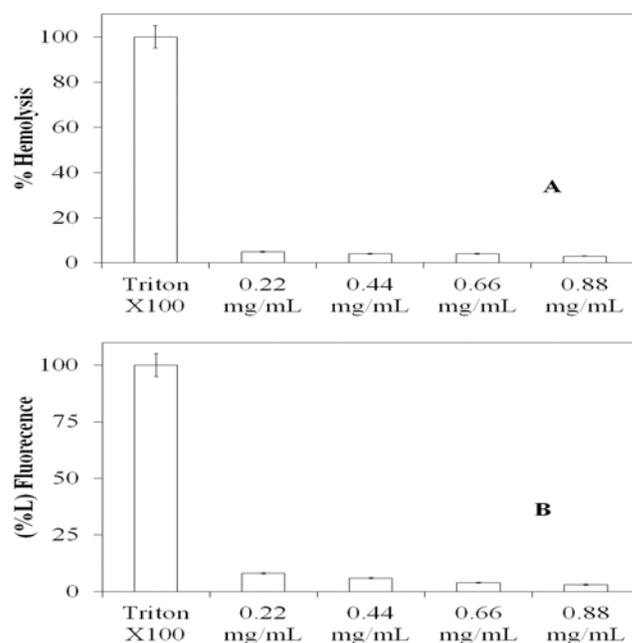


Figure 5. **A)** Hemolytic activities in blood cell of the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide at different concentration. **B)** Calcein Leakage from LUVs, induced by various concentration of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide.

host membrane consistent with the mode of action of AMPs [40]. The hydrophobic amino acids are in thermodynamically unfavorable environment in aqueous solution; while the cellular membrane may help its stabilization. Thus, the membrane is in a favorable environment for AMP. However, there is a thermodynamic cost paid by a change of their structures. The peptide moves from an alpha-helix to a random structure (Fig. 6A and B), to compensate all new electrostatic and hydrophobic interactions. The membrane also suffers changes in its properties such as density, diffusion and deuterium order parameter. An important observation is that the amino acid arginine interacts with the head group region of the membrane, thus, the interaction occurs with the high negative charge of the phosphate group (Fig. 6C - E). So, the peptide is not completely submerged into the membrane core (Fig. 6B). This interfacial localization may be described as a strong electrostatic interaction. The atom densities along the membrane give a rough picture of the distribution of the various groups in the system. The membrane may be divided in two groups: 1) The head groups formed by the cholines groups of the membrane and 2) the membrane core. The peptide is positioned at the membrane interface increasing the densities of the face exposed to the membrane. The membrane core density remains constant. The lateral diffusion of lipids in the membrane core is very important in order to understand the mode of action of the AMPs molecules, and it is related to the membrane functionality. A significant decrease of diffusion coefficient from $1.71 \pm 0.3 \times 10^{-7}$ to $1.43 \pm 0.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ may be due to the presence of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ and only when the random conformation was adopted on the interface membrane-water. We assume that the random conformation is the active structure of this

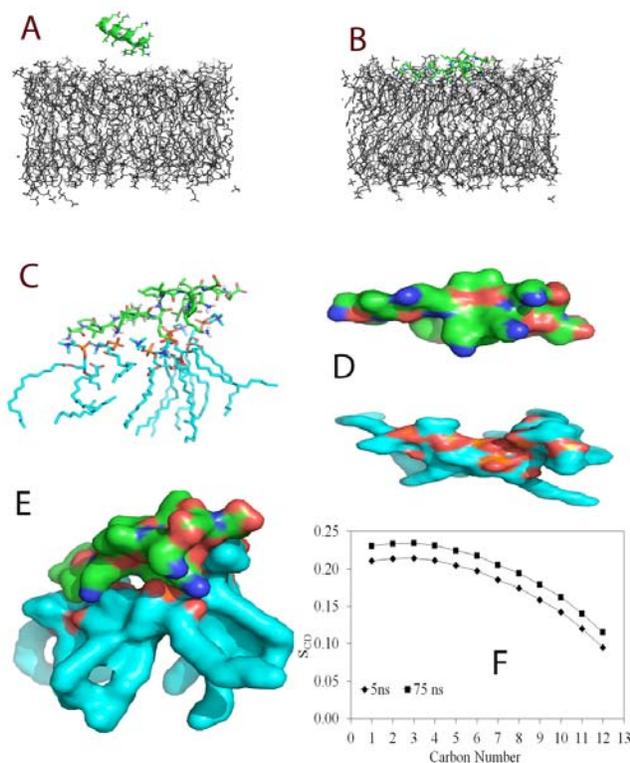


Figure 6. Molecular dynamics of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰. (A-B) Simulation Snapshots at 10 ns and 70ns. (C) Binding mode of peptide to membrane. Group phosphate of lipids and tails are colored of red and cyan. (D-E) Surface representation of the interface peptide-membrane. (F) Deuterium lipid order parameters of the acyl chains in DPPC, shown at 5 and 70 ns.

AMP. We have quantified this disorder by examining the changes in the deuterium order for the associated and non-associated lipid carbon tails (Fig. 6F). It appears that an increase of the order parameter occurs. The stabilization of the peptide has an ordering effect on the surrounding lipids.

3.6. Kinetic Model

We measured the decrease in peptide concentration after incubation with blood cell [30] to determine the correct form of the isotherm model equation. The trends of the experimental data (Fig. 7A) follows a Langmuir isothermal model.

The Langmuir isotherm model has a great general range of applications. This model is based on the specific interaction substrate (peptide) surface (membrane), therefore the results of adsorption and molecular dynamic and microbiological assay showed that the limiting step on the action mechanism of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ is the membrane interaction without formation of pores. We propose as a working hypothesis a kinetic model to understand this phenomenon. The model contains a membrane parameter that depends of on the adsorption velocity.

The kinetic model is represented by:



Where P_f is the fraction of peptide in extracellular medium and P_u is the fraction of peptide on the membrane. The absorption rate is k_f and k_s is constant of desorption. The kinetics are given by the following differential equations.

$$\frac{dP_u}{dt} = -k_f \theta P_u + k_s P_f. \quad (2)$$

$$\frac{dP_f}{dt} = k_f \theta P_u - k_s P_f. \quad (3)$$

θ is defined by the adsorption capacity at equilibrium divided the maximum adsorption capacity C , therefore θ is represented with:

$$\theta = \frac{P_f}{C}. \quad (5)$$

The solution of equation for P_f is then described by:

$$P_f(t) = \frac{1}{B - G e^{-k_{app} t}}. \quad (6)$$

Where

$$k_{app} = k_f^C [P_u]_o - k_s, \quad \text{and} \quad k_f^C = \frac{k_f}{C}.$$

$$G = B \frac{1}{k_f^C} \quad (7)$$

$$B = \frac{k_f^C \left(k_f^C [P_f]_o - (k_f^C [P_u]_o - k_s) \right)}{(k_f^C [P_u]_o - k_s) [P_f]_o} \quad (8)$$

The apparent rate constants, obtained from the single-exponential, fit to the experimental binding kinetic curves, were plotted against the peptide concentration (Fig. 7B), yielding a linear plot with slope k_f and y intercept k_s (Table 2).

The curves obtained were very well fit by a single-exponential function with R-square closely to 0.99. It demonstrated that the limit step is the membrane-peptide interaction for CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰.

4. DISCUSSION

The proposed hypothesis form part of the main project for obtaining AMPs based on phylogenetic analysis and physicochemical parameters related to structural and functional evidence of antimicrobial activity. This working hypothesis may lead us to identify possible new peptide candidates. Growth curves and antimicrobial activity studies indicate that CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ interacts with bacterial and yeast membranes causing growth inhibition. It may interact with mammalian cells without producing cellular death (Fig. 5).

Table 2. Adsorption and Desorption Constants for Kinetic Model (Equation 6)

| Concentration Peptide +/-0.50 mg/ml | k_{app} | B | G | k_f^C M ⁻¹ s ⁻¹ /C* | k_s s ⁻¹ | R ² |
|-------------------------------------|-----------|---------|---------|--|--------------------------|----------------|
| 0.250 | 0.01065 | 0.24197 | 0.20589 | 0.0174 | 0.0065 | 0.97 |
| 0.400 | 0.01408 | 0.33408 | 0.36321 | | | 0.99 |
| 0.500 | 0.01489 | 0.33265 | 0.37462 | | | 0.99 |

* Maxima adsorption capacity C (undimensionless)

* The rate constants were obtained from the fits of experimental kinetics to the model.

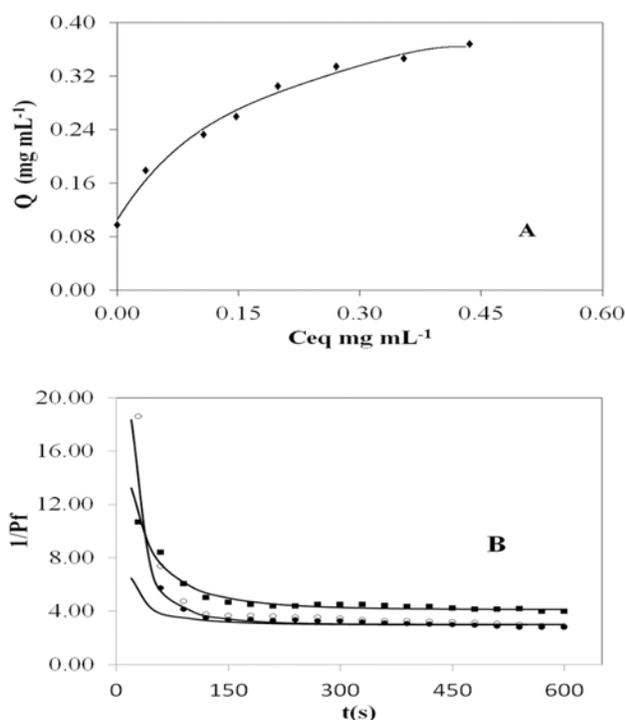


Figure 7. Kinetic Model. **A)** Correlation of experimental data of adsorption of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide on blood cell absorbent for Langmuir isotherm. **B)** Dynamic of adsorption. Dashed Lines (-Y-) 0.300 mg/mL of peptide. (-*-) 0.400mg/mL of peptide. (-λ-) 0.500 mg/mL of peptide. Model was fitted to data for all peptides (solid line), according to Equation 6.

The initial structure of the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide was not maintained during the whole simulations and under all tested conditions. Interestingly, the peptide acquires a random conformational structure. This conformation is different from those demonstrated in other studies when spontaneous random-to-helix conversion of the antimicrobial peptide on the membrane was reported [38]. The above consideration was confirmed by NMR studies, where chemokine's C-terminal shows a well-defined α -helix in an organic co-solvent system. This solvent has been used to mimic a membrane system with TFE (Fig. 2B). Thus, these study suggests that the increase in alpha-helix secondary structure in the membrane interface, increases the antimicrobial activity of AMPs. Our experimental evidence and computational simulation showed that the peptide does not penetrate the mem-

brane core and does not acquire an α -helix structure. The conformation of the CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide is constant after 50 ns similar to other simulations [41]. This work indicates that considering this conformation the capacity to display antimicrobial activity is in disagreement with other studies [16]. The above reinforce the importance of understanding the structure-function relationship described for electrostatic interaction and hydrophobic contacts in the peptide-membrane interface.

This study suggests that the host membrane interface restricts the atoms of the peptide backbone to a conformation with strong electrostatic interactions and hydrophobic contacts (Fig. 6A-D). Our simulations revealed the electrostatic interactions between backbone amides of the lysine residues with the phosphate moiety of the lipid head and hydrophobic contacts exist between tyrosine residue and lipids. These contacts are affected by the proline residue. The presence of a proline residue in the backbone of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ decreased the possibility of α -helical conversion, and increased the random conformation. We suggest that the stabilization of this structure on the interface allows the AMP to achieve the active conformation. This active structure reduces the energy cost of partitioning a peptide into the interface region for bacterial and mammalian membranes.

At a high negative charge surface density a deeper insertion into the bilayer is inhibited, but surface accumulation of a large amount of peptides is in agreement with the adsorption Langmuir model (Fig. 7A). The Langmuir isotherm is based on the assumption of homogeneity in the system, that is, equally available adsorption active sites, monolayer surface coverage, and no interaction between adsorbed species. The active sites in the target membrane are the negative charge phosphate groups of the lipids. The AMP conformational change in the membrane interface covers contiguous active sites and increases the peptide-peptide weak interactions with the interface generating a multilayer at the membrane surface. The formation of a multilayer in the interface allowed the formation of aggregates in the membrane surface. These multilayers are the first step in several models agreeing with the carpet model [42].

Our results also indicate a rapid adsorption of the AMP (Fig. 7), without any indication of a cell disruption and thus suggesting an homogeneous distribution of the peptides in the outer membrane. However, we considered that the membrane-peptide interaction disturbs the bilayer by decreasing the lateral diffusion of lipids, and increasing the order pa-

parameter in the lipid's carbon atoms that are near the membrane core. Thus, the insertion and stabilization of this peptide in the membrane have an effect in the order of lipids and consequently alters its functionality. We suggest that the AMP adopts an active conformation upon interaction with negatively charged groups in the membrane. At the membrane interface, the peptides are leading to formation of rigid domains, localized around the peptide. These zones of different rigidity and velocity could promote lipid segregation of peptides, and temperature-induced effects. This peptide-induced segregation of different types of lipids will change the density and the polarity of the membrane and consequently alter and destabilize the membrane. The different lateral velocity of peptides in the membrane is related to the temperature gradient in the membrane.

The conventional and modified formalism of AMP-induced membrane perturbation assumes that the conformation acquired by CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ does not create a disturbance in the membrane; it only aggregates and therefore it has no antimicrobial activity [16]. We showed in (Fig. 4) that if there is antimicrobial activity when compared to the other peptides it is not strong enough to produce lysis (Fig. 5), furthermore it has very low hemolytic activity. This characteristic is very important for clinical applications. Another important feature is the high amount of this type of AMP necessary to achieve antimicrobial activity. The immune system would never produce such a high amount of this protein in comparison to the amount used in this work. We suggest that the α -helix region of C-terminal of platelet factor 4 can stabilize the contact of N-terminal domain with the ligand, because this limits the mobility of the surrounding lipids.

A given amino acid sequence can adopt different conformations depending on the solvent environment (Fig. 2A). These conformations change the adsorption mechanism, from solution to membrane and at membrane surface. The culture mediums have high amounts of salts, protein and glycolipids that could promote folding of AMP before it is adsorbed in the membrane. However, one should be careful in making generalizations for that is not the case of many AMPs. The exact effect of the conformation of peptide before of adsorbed is probably a function peptide chemical nature.

One the most important questions in molecular biology and in the mode of action of AMPs is what determines folding pathways on the membrane interface. The lack of a relationship between stabilities and folding rates of diverse peptides indicates that the topology is a critical determinant of the model of action of AMPs. Here, we determined a constant rate related to its binding, this is the lowest reported yet [17]. This is due to the hydrophobic membrane environment and to the electrostatic interactions between the peptide and the membrane. The amount of free energy showed the irreversibility of phenomena [17, 43]. This mechanism suggests the activation barrier is valid only in low surface coverage. In light of this result, further studies of the adsorption of the peptide must be performed. The analysis presented here, on the other hand, shows that the agreement on a kinetic model with the experimental data in order to understand its mode of action.

CONCLUSION

The CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ peptide is an AMP with bacteriostatic effect, and interesting low hemolytic activity. The mode of action can be rationalized in the following highly interconnected sequence of events:

1. Diffusion of peptide from solution to the membrane, the initial conformation of the peptide in solution can either be structured or unstructured, depending on whether the solution has an hydrophobic or polar environment.
2. Electrostatic interaction of the lysine of CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ with phosphate groups of head lipid group. The head groups are the active sites, where electrostatic interaction with the peptide allows to fix the peptide to the membrane surface.
3. Formation of rigid domains around the peptide.
4. Antimicrobial activity, by promoting lipid segregation of peptides and variation in their lateral mobility.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grant of CONACYT México Number 240061. We wish to thank the Biomacromolecular group of the Professor Roberto Arreguín for expert technical and assistance and PhD. Luis H. Blanco.

REFERENCES

- [1] Hancox, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.*, **2001**, 1, 156–164.
- [2] Powers, J.P.S.; Hancock R.E.W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides.*, **2003**, 24, 1681–1691.
- [3] Wimley, W.C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem. Biol.*, **2010**, 5, 905–917.
- [4] Brown, K.L.; Hancock, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, **2006**, 18, 24–30.
- [5] Huang, Y.; Huang, J.; Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell.*, **2010**, 1, 143–152.
- [6] Chen, Y.; Mant, C.T.; Farmer, S.W.; Hancock, R.E.W.; Vasil, M.L.; et al. Rational Design of alpha-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / *Therapeutic Index*. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 12316–12329.
- [7] Park, C.; Cho, J.; Lee, J.; Lee, D.G. Membranolytic antifungal activity of arenicin-1 requires the N-terminal tryptophan and the beta-turn arginine. *Biotech. Lett.*, **2011**, 33, 185–189.
- [8] Dennison, S.R.; Wallace, J.; Harri,s F.; Phoenix, D. Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Prot. Pept. Lett.*, **2005**, 12, 31–39.
- [9] Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature.*, 2002, 415, 389–395.
- [10] Jiang, Z.; Vasil, A.I.; Hale, J.D.; Hancock, R.E.W.; Vasil, M.L.; et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers.*, **2008**, 90, 369–383.
- [11] Kovacs, J.M.; Mant, C.T.; Hodges, R.S. Determination of Intrinsic Hydrophilicity / Hydrophobicity of Amino Acid Side Chains in Peptides in the Absence of Nearest-Neighbor or Conformational Effects. *Biopolymers.*, **2006**, 84, 283–297.
- [12] Mahalka, A.K.; Kinnunen, P.K.J. Binding of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides to lipid membranes: lessons from

- temporins B and L. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2009**, 1788, 1600–1609.
- [13] Andrushchenko, V.V.; Aarabi, M.H.; Nguyen, L.T.; Prenner, E.J.; Vogel, H.J. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2008**, 1778, 1004–1014.
- [14] Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. Translocation of a Channel-Forming Antimicrobial Peptide, Magainin 2, across Lipid Bilayers by Forming a Pore. *Biochemistry.*, **1995**, 34, 6521–6526.
- [15] Shoemaker, S.D.; Vanderlick, T.K. Intramembrane electrostatic interactions destabilize lipid vesicles. *Biophys. J.*, **2002**, 83, 2007–2014.
- [16] Khandelia, H.; Ipsen, J.H.; Mouritsen, O.G. The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2008**, 1778, 1528–1536.
- [17] Middelberg, P.; Radke, C.J.; Blanch, H.W. Peptide interfacial adsorption is kinetically limited by the thermodynamic stability of self association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97, 5054–5059.
- [18] Yang, L.; Harroun, T.; Weiss, T.M.; Ding, L.; Huang, H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.*, **2001**, 81, 1475–1485.
- [19] White, S.H.; Wimley, W.C. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1999**, 28, 319–365.
- [20] Bolintineanu, D.S.; Kaznessis, Y.N. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review. *Peptides.*, **2011**, 32, 188–201.
- [21] Langham, A.; Kaznessis, N.Y. Molecular Simulations of Antimicrobial Peptides. *Meth. Mol. Biol.*, **2010**, 618, 1–18.
- [22] Stavrakoudis, A.; Tsoulos, I.G.; Shenkarev, Z.O.; Ovchinnikova, T.V. Molecular dynamics simulation of antimicrobial peptide arenicin-2: beta-hairpin stabilization by noncovalent interactions. *Biopolymers.*, **2009**, 92, 143–155.
- [23] Ambroggio, E.E.; Separovic, F.; Bowie, J.; Fidelio, G.D. Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2004**, 1664, 31–37.
- [24] Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, **1994**, 22, 4673–4680.
- [25] Henikoff, S.; Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, 89, 10915–10919.
- [26] Eddy, S.R. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nature Biotech.*, **2004**, 22, 1035–1036.
- [27] Davison, A.C.; Kuonen, D. An Introduction to the Bootstrap with Applications in R. *Stat. Comp. Graph.*, **2002**, 13:6–11.
- [28] Puigbò, P.; Garcia-Vallvé, S.; Mc Inerney, J.O. TOPD/FMTS: a new software to compare phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **2007**, 23, 1556–1558.
- [29] Sreerama, N.; Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **2000**, 287, 252–260.
- [30] Strom, M.B.; Rekdal, O.; Svendsen, J.S. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. *J. Pept. Sci.*, **2002**, 8, 431–437.
- [31] Nguyen, L.T.; Chau, J.K.; Perry, N.A.; De Boer, L.; Zaat, S.A.J.; Vogel, H.J. Serum stabilities of short tryptophan and arginine rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS ONE.*, **2010**, 5(9): e12684.
- [32] Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A.E.; et al. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comp. Chem.*, **2005**, 26, 1701–1718.
- [33] Biocomputing group. <http://moose.bio.ucalgary.ca> (Accessed January 20, 2010).
- [34] Humphrey, W.; Dalke, A. K. S. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics. Modell.*, **1996**, 14, 1996–1996.
- [35] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.; Particle mesh Ewald: An N Log(N) method for Edwal sums in large system. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 27709, 10089–10092.
- [36] Xu, P.; Shi, M.; Chen X.X. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *PLoS ONE.*, **2009**, 4, e4239.
- [37] Muñoz, V.; Serrano, L. Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nature.*, **1994**, 1, 399–409.
- [38] Rapson, A.C.; Hossain, M.A.; Wade, J.D.; Nice, E.C.; Smith, T. Structural dynamics of a lytic peptide interacting with a supported lipid bilayer. *Biophys. J.*, **2011**, 100, 1353–1361.
- [39] Antharam, V.C.; Elliott, D.W.; Mills, F.D.; Farver, R.S.; Sternin, E. Penetration depth of surfactant peptide KL4 into membranes is determined by fatty acid saturation. *Biophys. J.*, **2009**, 96, 4085–4098.
- [40] Aroui, A.; Dathe, M.; Blume, A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes? *Biochim. Biophys. Acta.*, **2009**, 1788, 650–659.
- [41] Hsu, J.C.Y.; Yip, C.M. Molecular dynamics simulations of indolicidin association with model lipid bilayers. *Biophys. J.*, **2007**, 92, L100–L102.
- [42] Mazzuca, C.; Orioni, B.; Coletta, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C. Fluctuations and the rate-limiting step of peptide-induced membrane leakage. *Biophys. J.*, **2010**, 99, 1791–1800.
- [43] Gregory, S.M.; Cavanaugh, A.; Journigan, V.; Pokorny, A.; Almeida P.F.F. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys. J.*, **2008**, 94, 1667–1680.