

ESTRUCTURA CONFORMACIONAL E INTERACCIÓN CON VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS Y POLIDIACETILENO DE TRES PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS AISLADOS DE LA PIEL DE *HYPISIBOAS PULCHELLUS* (ANURA: HYLIDAE)

Siano, Alvaro¹, Gatti, Paula¹, Simonetta, Arturo³, Lajmanovich, Rafael², Tonarelli, Georgina¹.

¹Laboratorio de Péptidos Bioactivos. Departamento de Química Orgánica, ²Cátedra de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe (3000). Argentina. E-mail: asiano@fbc.unl.edu.ar

³ Cátedras de Microbiología y Biotecnología del Dpto. de Ing. en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, UNL. Santa Fe (3000). Argentina

Introducción

Los péptidos antimicrobianos forman parte de la inmunidad innata de muchos organismos superiores como plantas, insectos, anfibios y mamíferos. Sobre la base de su rápido mecanismo de acción, se ha sugerido que constituyen la primera línea de defensa contra bacterias, virus y hongos (1).

Como resultado de estudios peptidómicos realizados con muestras de piel y de secreciones glandulares de la rana del zarzal, *Hypsiboas pulchellus* (Hp), se identificó un total de 23 secuencias, la mayoría inéditas. Tres de estas secuencias fueron seleccionadas y sintetizadas en fase sólida por la química Fmoc, para estudiar sus propiedades antimicrobianas e investigar probables mecanismos de acción.

Se utilizó un ensayo colorimétrico para estudiar la interacción de los análogos con vesículas de fosfolípidos y ácido 10,12-tricosadienoico polimerizado (PDA), de color azul (2). La interacción de un péptido con estas vesículas produce un cambio de color de azul a rojo, el que se cuantifica a través del valor de respuesta cromática (RC), en función de la concentración de péptido. Conjuntamente con estos estudios, se realizaron análisis por Dicroísmo Circular (DC), a fin de investigar cambios conformacionales en presencia de vesículas constituidas por fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos.

Resultados

Las secuencias de los péptidos sintetizados, conjuntamente con las propiedades fisicoquímicas y estructurales, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias y características estructurales de los análogos sintetizados

| Identificación | Secuencia | Carga Neta a pH=7 | Predicción estructura secundaria | PM | H % |
|----------------|-----------------------|-------------------|---|----------|-----|
| | | | PSIPREDEDD | | |
| P4-Hp-1971 | TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR | +4 | Coil | 1971,173 | 33 |
| P5-Hp-1935 | KLSPSLGPVSKGKLLAGQR | +5 | Coil | 1935,209 | 31 |
| P6-Hp-1891 | RLGTALPALLKTLLAGLNG | +3 | Hélice (T ₄ -L ₁₇) | 1891,241 | 52 |

Secuencias determinada por ESI-MS-MS. PM: peso molecular experimental. H%: porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos.

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a dos cepas

bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25929.

Se calculó el Índice Terapéutico (IT), el cual se define como la relación entre la Concentración Hemolítica Mínima (CHM, mínima concentración de péptido que produce el 100% de hemólisis) y el valor de CIM.

Los resultados de ambas determinaciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. . CIM, CHM e IT de los análogos sintetizados frente a *S. aureus* y *E. coli*

| Análogo Identificación | CIM (μM) | | CHM (μM) | Índice Terapéutico (IT) | |
|---------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| P4-Hp-1971 | 16 | 8 | 640 | 40 | 80 |
| P5-Hp-1935 | 33 | 66 | 320 | 9.7 | 4.9 |
| P6-Hp-1891 | 17 | 17 | 25 | 1.5 | 1.5 |

El mayor valor de IT lo presentó el análogo P4-Hp-1971, resultado que guarda relación con su mayor actividad antimicrobiana (CIM: 16 μM para *E. coli* y 8 μM para *S. aureus*) y baja actividad hemolítica, en todo el rango de concentraciones ensayado (hasta 320 μM).

La estructura conformacional se investigó por DC y la deconvolución de los espectros se realizó por los métodos CONTILL y SELCON 3, incluidos en el software CDPro. Estos análisis demostraron que en medio acuoso los péptidos no están estructurados, y que en presencia de vesículas de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) P6-Hp-1891 adopta una estructura predominantemente helicoidal (70%), y en menor medida lo hace el análogo P5-Hp-1935 (36%), mientras que para P4-Hp-1971 el espectro fue similar al obtenido en medio acuoso.

En el ensayo cromático con vesículas de DPPG-PDA los mayores valores de RC se obtuvieron con el análogo P6-Hp-1891, en concentraciones próximas a 250 μM (RC: 45%), mientras que para los análogos P5-Hp-1935 y P4-Hp-1971, los valores máximos de RC se encontraron a 150 μM (35 y 25 % respectivamente). Los resultados evidenciaron que solamente el análogo P6-Hp-1891 interaccionó significativamente con las vesículas de DPPG-PDA, la que aumentó con la concentración de péptido, hasta aproximadamente 300 μM . Estos hechos pueden ser explicados teniendo en cuenta que el péptido adopta una estructura helicoidal anfipática en presencia de vesículas de DPPG, y que posee un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos (52%) adecuado para interaccionar con membranas. Su cationicidad (carga neta +3) sería suficiente para lograr una buena interacción electrostática inicial con las cabezas polares aniónicas de los fosfolípidos de membrana.

La interacción de los análogos P4-Hp-1971 y P5-Hp-1935 con vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina-colesterol-PDA (DPPC-Col-PDA) fue baja, en todo el rango de concentraciones investigado, resultados que se correlacionaron con los obtenidos por DC en presencia de vesículas de DPPC, y con la baja actividad hemolítica que presentaron. En cambio, el análogo P6-Hp-1891 fue el que más interaccionó con las vesículas de DPPC-Col-PDA, y este resultado se correlacionó con su elevada actividad hemolítica.

Los resultados de DC y de interacción con vesículas claramente evidencian que P6-Hp-1891 actúa permeabilizando las membranas bacterianas mientras que P4-Hp-1971, el análogo más activo de los tres sintetizados, a pesar de su cationicidad actuaría por otro mecanismo de acción, aún no dilucidado. En este sentido, investigaciones recientes han demostrado que péptidos antimicrobianos que contienen un predominio de uno o dos aminoácidos específicos, actúan interaccionando con blancos intracelulares, inhibiendo la síntesis de ADN, de proteínas y de la pared celular, entre otros (3).

Conclusiones

Sobre la base de los resultados obtenidos con los péptidos que presentaron mayor actividad antimicrobiana se concluye que P6-Hp-1891 es un péptido helicoidal cuyo blanco de acción es la membrana bacteriana, mientras que para P4-Hp-1971, péptido rico en glicina y prolina, deberán realizarse estudios adicionales para definir un probable mecanismo de acción.

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Fernando Albericio y a la Dra. Eliandre de Oliveira de la Universidad de Barcelona, por su generosa colaboración en los estudios peptidómicos realizados por Espectrometría de Masas.

Referencias

- (1) Marshall, S.H., Arenas, G., 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Elect J Biotech* 6(3), 96-109.
- (2) Siano, A., Humpola, V., Rey, C., Simonetta, A., Tonarelli, G. 2011. Interaction of Acylated and Substituted Antimicrobial Peptide Analogs with Phospholipid-Polydiacetylene Vesicles. Correlation with their Biological Properties. *Chem Biol Drug Des.* 78, 85-93.
- (3) Nicolas, P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 276(22):6483-96.