

Capítulo 9

Péptidos antimicrobianos de plantas

Jesús Josafath Quezada Rivera
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Juárez del Estado de Durango

Mariana Georgina Muñoz Carrillo
José Francisco Morales Domínguez
Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Resumen

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) forman parte importante del sistema inmunitario innato de todos los seres vivos. Son antibióticos de origen peptídico y constituyen la primera línea de defensa del organismo. En plantas estos compuestos se sintetizan para resistir el estrés causado por el ataque de algún depredador o patógeno y suelen ser efectivos en la inhibición de agentes potencialmente dañinos. Esta característica los ha vuelto atractivos para ser utilizados como una alternativa a los antibióticos convencionales ya que difícilmente los patógenos muestran resistencia hacia estos compuestos. No obstante, el aislamiento a partir de fuentes naturales es un proceso laborioso y lento, por lo que se suele realizar la síntesis química que, aunque muy eficiente, es un proceso complejo y costoso. Por

lo que tampoco es una vía ideal para la producción de péptidos a gran escala. Una opción viable es la tecnología del DNA recombinante que comparada con la síntesis química resulta ser escalable, accesible y con la capacidad de producir PAMs efectivos. Dentro de las plataformas de expresión de estos péptidos podemos mencionar *Escherichia coli*, levaduras como *Pichia pastoris* y una gran diversidad de plantas como *Nicotiana tabacum*. Esta tecnología hace posible la obtención de PAMs efectivos y a gran escala.

Introducción

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son componentes indispensables de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos. Son la primera línea de defensa constitutiva inducida por una infección de agentes nocivos, deteniendo a la mayoría de las infecciones antes de que causen algún daño celular o síntoma. Estructuralmente los PAMs son oligopéptidos de entre 2 a 9 kDa, con una longitud de 10-50 residuos de aminoácidos. Presentan una estructura helicoidal de naturaleza catiónica y anfipática o hidrofóbica, lo que facilita la interacción inicial con la membrana bacteriana que está cargada negativamente, dañándola y provocando la muerte celular, además estos péptidos muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos, virus y parásitos eucariotas.

Hasta la fecha, más de 5,000 PAMs han sido descubiertos o sintetizados. Tanto procariontes como eucariotas pueden sintetizar PAMs de manera natural. A diferencia de los antibióticos convencionales, que en general, se dirigen hacia una enzima y pueden selectivamente inducir resistencia, los PAMs inhiben microorganismos principalmente por mecanismos de formación de poros dirigidos a la membrana, un mecanismo que es inherentemente más difícil para que estos desarrollen algún tipo de resistencia.

PAMs reportados en plantas

Las plantas son seres vivos inmóviles que al igual que otros organismos son vulnerables a infecciones microbianas. Estas han evolucionado y desarrollado eficaces sistemas de defensa contra patógenos. Estas medidas de defensa

incluyen barreras físicas contra su penetración y propagación, como capas cerosas de cutículas y tricomas, y barreras químicas para inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos, como sistemas complejos de reconocimiento celular, redes intrincadas de fitohormonas, innumerables vías transcripcionales, diversas proteínas y metabolitos secundarios. Entre las moléculas de defensa de las plantas, los PAMs son una de las barreras químicas más comunes que las plantas han desarrollado para resistir el estrés biótico. La síntesis de PAMs ocurre a nivel sistémico en casi todas las partes de una planta durante cualquier etapa de su vida. Por ejemplo, las semillas de la planta de rábano producen continuamente PAMs pertenecientes a la familia de las defensinas. Durante la germinación de estas semillas, la producción de defensinas aumenta significativamente para ayudar a proteger las plántulas contra los patógenos.

Estos PAMs han sido el foco de interés en investigación para comprender su relación e interacción con patógenos de plantas, patógenos del deterioro de alimentos e incluso la salud humana. Patógenos importantes como *Pythium graminicola*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* y *Aspergillus niger* son organismos con capacidad de afectar cultivos, pero que han sido inhibidos con éxito por los PAMs sintetizados y extraídos del arroz, tubérculos de papa, amaranto, chicharos, etc. Por su parte el péptido de tionina producido por *Arabidopsis thaliana* es efectivo inhibidor contra los patógenos comunes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Mientras que el péptido clasificado como ciclotido sintetizado por la planta *Viola odorata* es efectivo contra *Klebsiella pneumoniae*. Se ha reportado el aislamiento de un buen número de PAMs sintetizados por plantas, los cuales se enlistan en la tabla 9.1.

Tabla 9.1. Péptidos antimicrobianos de origen vegetal

Fuente	Nombre	Tipo	Características	Actividad
<i>Raphanus sativus</i>	Rs-AFP1	Defensina	Péptidos altamente básicos, ricos en residuos de cisteína; pesos moleculares de 5 kDa; Contienen carga neta de +4 y +6, respectivamente. Motivo $\alpha\beta$ estabilizado con cisteína típico de las defensinas vegetales	Antifúngico (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>)
	Rs-AFP2			
<i>Medicago sativa</i>	MsDef1	Defensina	Una región conservada de dos hebras beta antiparalelas con un bucle interpuesto que contiene una carga catiónica. La carga neta para MsDef1 es +3 y +6 para MtDef4	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)
	MtDef4			
<i>Impatiens balsamina</i>	IbAMP1	Defensina	Péptido altamente básico. Contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro intramoleculares. Contiene una carga neta de +5	Antibacteriano (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
<i>Vigna unguiculata</i>	Cp-thionin II	Defensina	La conformación se estabiliza mediante cuatro enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Contiene una carga neta de +8	Antifúngico (<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium expansum</i>)
<i>Tulipa gesneriana</i>	Tu-AMP 1	Tionina	Péptido rico en cisteína y aminoácidos básicos (arginina y lisina). Péptido monocatenario que contiene cuatro enlaces disulfuro	Antimicrobiano (<i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Curtobacterium flaccumfacien</i>)
	Tu-AMP 2	Tionina	Péptido rico en cisteína y aminoácidos básicos (arginina y lisina). Péptido con una estructura única; es un heterodímero con cadena α y β	
<i>Triticum aestivum</i>	β -Purotionina de trigo	Tionina	Péptido que contiene 8 cisteínas y 10 residuos básicos. 4 enlaces disulfuro están presentes	Antibacterial (<i>Corynebacterium michiganense</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tionina 2.4	Tionina	Un péptido de 5 kDa con 3 enlaces disulfuro presentes en su secuencia. Contiene una carga neta de +1	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)

Fuente	Nombre	Tipo	Características	Actividad
<i>Medicago sativa</i>	MsSN1	Snakina	MsSN1 contiene 12 residuos de cisteína con una región conservada al extremo C-terminal	Antifúngico (<i>Phytophthora medicaginis</i>)
<i>Ziziphus jujuba</i>	Snakin-Z	Snakina	Un péptido conformado por 31 aminoácidos con un peso molecular de 3.318 kDa	Antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>Viola odorata</i>	Cycloviolacin O2	Ciclotido	Los péptidos consisten en una columna vertebral circular y 3 puentes disulfuro que están dispuestos en forma de nudo. Los péptidos contienen una carga neta de +2	Antibacteriano (<i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>)
<i>Mirabilis jalapa</i>	Mj-AMP1	Knotina	Los péptidos son muy básicos y contienen 3 puentes disulfuro dentro de sus estructuras. Ambos péptidos contienen una carga neta de +3	Antifúngico (<i>F. oxysporum</i>)
<i>Euonymus europaeus</i>	Ee-CBP	Tipo Hevein	El péptido contiene 5 puentes disulfuro (unidos por 10 residuos de cisteína presentes en su estructura) y una carga neta de +5	Antifúngico (<i>F. culmorum</i> y <i>Alternaria brassicicola</i>)
<i>Stellaria media</i>	SmAMP3	Tipo Hevein	Un péptido básico y rico en cisteína que contiene una carga neta de +2 y 3 puentes disulfuro en su estructura	Antifúngico (<i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium solani</i>)
<i>Helianthus annuus</i>	Ha-AP10	Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	Un péptido básico de 10 kDa que contiene 4 puentes disulfuro	Antifúngico (<i>Fusarium solani</i>)
<i>Capsicum annuum</i>	Ca-LTP1	Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	Un péptido de 9 kDa con 4 α -hélices dentro de su estructura	Antifúngico (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)
<i>Passiflora edulis</i>	Pe-AFP1	2S albumin	El péptido consta de 2 enlaces disulfuro en su secuencia formada por 2 residuos de cisteína conservados	Antifúngico (<i>F. oxysporum</i>)
<i>Malva parviflora</i>	CW-1	2S albumin	Un péptido de 15 aminoácidos con un peso molecular de 1,783 kDa	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)

Clasificación de PAMs

La gran diversidad de PAMs sintetizados o producidos de forma natural dificulta su clasificación. Por lo que se suelen clasificar según: 1) la maquinaria biosintética productora, 2) la fuente biológica que los produce, 3) su actividad inhibitoria, 4) sus características estructurales, 5) sus especies ricas en aminoácidos y según 6) sus objetivos moleculares (Fig. 9.1).

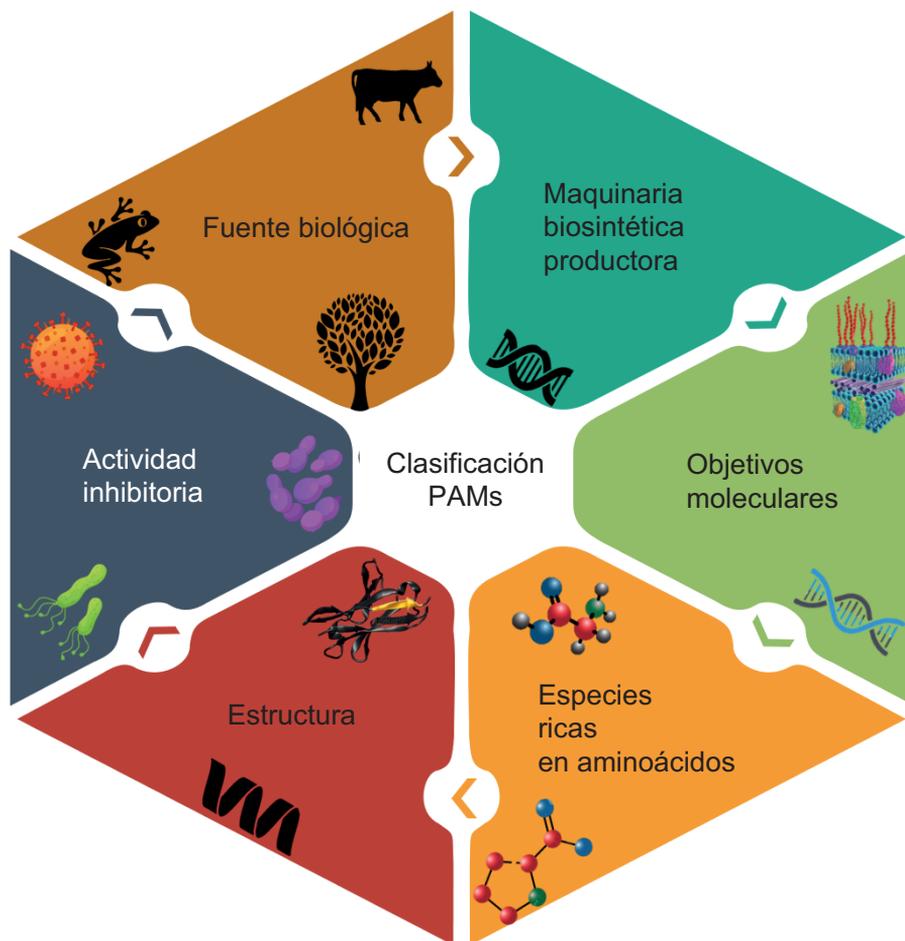


Figura 9.1. Clasificación de péptidos antimicrobianos.

Clasificación según la maquinaria biosintética productora

La gran mayoría de los PAMs son codificados por genes y algunos otros son sintetizados por sistemas enzimáticos múltiples, por ejemplo, algunos PAMs son liberados tras la proteólisis de la glicoproteína lactoferrina por medio de diversas enzimas proteolíticas.

Clasificación según la fuente de producción

De acuerdo a lo reportado en la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (APD3) las fuentes de PAMs pueden ser divididas en mamíferos, plantas, anfibios, insectos y microorganismos.

PAMs derivados de mamíferos

En mamíferos, los PAMs se encuentran principalmente dentro de gránulos de los neutrófilos y en las secreciones de las células epiteliales que cubren la piel y las superficies mucosas. Generalmente, los PAMs se codifican en grupos en el genoma y se expresan conjuntamente, lo que da como resultado que se acumulen múltiples péptidos en un solo sitio. Un buen número de PAMs se producen como precursores inactivos que requieren escisión proteolítica para volverse activos por lo que su regulación no solo depende de su propia expresión, sino también de la abundancia de proteasas apropiadas. La mayoría de PAMs de mamíferos se han reportado en humanos, ovejas, vacas y otros vertebrados. Las defensinas y las catelicidinas son las principales familias de PAMs en mamíferos. Las defensinas se pueden dividir en α -, β - y θ -defensinas según la posición de los enlaces disulfuro. Los péptidos de defensa del huésped humano (PDH) pueden proteger a los humanos de infecciones microbianas, sin embargo, la expresión o producción de estos se realiza de forma diferencial de acuerdo a la etapa del crecimiento humano. Por ejemplo, la catelicidina LL-37, generalmente se detecta en la piel de los recién nacidos, mientras que la beta-defensina 2 humana (hBD-2) generalmente se expresa en los ancianos. Los PDH se pueden identificar en varias partes del cuerpo, como la piel, ojos, oídos, boca, vías respiratorias, pulmones, intestino y la uretra. Destacar que los PAMs encontrados en la leche materna humana también juegan un papel importante en la lactancia porque pueden disminuir la morbilidad y mortalidad

de los lactantes. Además de la actividad antimicrobiana, las PDH (catelicidinas y defensinas), también afectan la regulación inmunitaria, la apoptosis y la cicatrización de heridas.

PAMs derivados de plantas

Se han reportado PAMs de plantas a partir de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de una amplia variedad de especies. Dichos péptidos han demostrado actividades contra fitopatógenos, así como contra organismos patógenos para humanos, virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y células neoplásicas. El repertorio de PAMs sintetizados por las plantas es extremadamente grande con cientos de péptidos diferentes en algunas especies de plantas. En este grupo biológico la mayoría de los PAMs son ricos en cisteína (Cys), una característica que permite la formación de múltiples enlaces disulfuro (generalmente de dos a seis) que contribuyen a una estructura compacta y resistencia a la degradación química y proteolítica. Los PAMs se dividen en familias en función de su similitud de secuencia, motivos Cys y patrones distintivos de enlaces disulfuro que, a su vez, determinan el plegamiento de su estructura terciaria. Las principales familias de PAMs comprenden defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, ciclótidos, snakinas y proteínas tipo heveína, según la homología de secuencia de aminoácidos.

PAMs derivados de anfibios

Las ranas son la principal fuente de PAMs de anfibios y la magainina es el péptido más famoso ya que las secreciones cutáneas de las ranas de los géneros *Xenopus*, *Silurana*, *Hymenochirus* y *Pseudhymenochirus* de la familia Pipidae son ricas en PAMs. Al igual que en los mamíferos, estos péptidos juegan un papel importante en la protección de los anfibios de los patógenos que han disminuido la población mundial de anfibios.

PAMs derivados de insectos

En insectos los PAMs se sintetizan principalmente en los cuerpos grasos y las células sanguíneas, esta característica es una de las principales razones por las que este grupo biológico tiene una gran adaptabilidad para sobrevivir. La Cecropina es la familia más importante de PAMs de insectos, y se puede encontrar en gusanos de seda, abejas, *Drosophila*, etc. La síntesis de PAMs varía mucho entre las especies, por ejemplo, la mariquita (*Harmonia axyridis*) y la mosca soldado (*Hermetia illucens*) tienen hasta 50 PAMs, mientras que el pulgón del guisante (*Acyrtosiphon pisum*) carece de estos péptidos. El péptido jeleina derivado de la jalea real de abejas muestra efectos promisorios contra bacterias y hongos y conjugado con ácido láurico tiene el potencial de inhibir al protozoario parásito *Leishmania major*.

PAMs derivados de microorganismos

Todos los organismos vivos sin excepción producen PAMs, incluso los considerados como patógenos (bacterias y hongos). Los PAMs sintetizados por bacterias se denominan bacteriocinas y son péptidos sintetizados ribosomalmente de tamaño pequeño (30-60 aminoácidos), de naturaleza catiónica, termo estables (100 °C por 10 min), activos y altamente específicos contra bacterias muy relacionadas al organismo productor (espectro estrecho) o contra bacterias de otro género (amplio espectro). Las bacterias productoras de PAMs son inmunes a sus propias bacteriocinas, debido a la síntesis de proteínas de inmunidad específica. El grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) es uno de los principales productores de bacteriocinas y de los más estudiados debido a que la mayoría de estas bacterias son aisladas de fuentes alimentarias, por lo que se consideran como bacterias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, Generally Recognized As Safe).

Clasificación según su actividad inhibitoria

PAMs antivirales

Los PAMs antivirales neutralizan los virus al integrarse a la envoltura viral o a la membrana de la célula hospedera causando su inestabilidad, lo que propicia que los virus no puedan infectar las células del huésped. También pueden reducir la unión de virus a las células huésped. Por ejemplo, las defensinas se unen a las glicoproteínas virales haciendo que los virus del herpes simple (VHS) no puedan unirse a la superficie de las células del huésped. Además de la interrupción de las envolturas virales y el bloqueo de los receptores virales, algunos PAMs pueden evitar que las partículas virales ingresen a las células hospedadoras al ocupar receptores específicos en células de mamíferos.

PAMs antibacterianos

Los péptidos antibacterianos son los PAMs más estudiados hasta la fecha y la mayoría de ellos son catiónicos, dirigiéndose a la membrana celular bacteriana provocando la desintegración de la estructura de la bicapa lipídica. La mayoría de estos péptidos son anfipáticos con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que les proporciona la capacidad de unirse a los componentes lipídicos (región hidrofóbica) y a los grupos de fosfolípidos (región hidrófila). De forma interesante, se ha demostrado que algunos PAMs a bajas concentraciones pueden eliminar bacterias sin cambiar la integridad de las membranas, gracias a la inhibición de algunas vías importantes dentro de la célula como la replicación del DNA y la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la buforina II puede difundirse en las células y unirse al DNA o RNA sin dañar la membrana celular.

PAMs antifúngicos

Al igual que los PAMs antibacterianos, los péptidos antifúngicos pueden matar hongos al dirigirse a la pared celular o a los componentes intracelulares. Sin embargo, la membrana celular bacteriana y la pared celular de hongos tienen diferentes contenidos. La quitina es uno de los principales componentes de las paredes celulares de los hongos y algunos de los péptidos antifúngicos son capaces de unirse a la quitina. Tal capacidad de unión ayuda a los PAMs a

atacar las células fúngicas de manera eficiente. Los PAMs dirigidos a la pared celular matan a las células diana debido a una alteración de la integridad de las membranas fúngicas, al aumento de la permeabilización de la membrana plasmática o a la formación de poros directamente. Aunque la mayoría de los PAMs antifúngicos contienen aminoácidos polares y neutros en sus estructuras, no parece haber una correlación clara entre la estructura del PAM y el tipo de células a eliminar.

PAMs antiparasitarios

Los PAMs antiparasitarios son un grupo más pequeño en comparación con las otras tres clases de PAMs. Aunque algunos microorganismos parásitos son multicelulares, el modo de acción de los péptidos antiparasitarios es el mismo que el de otros PAMs, ya que matan a las células al interactuar directamente con la membrana celular. Ejemplos de este tipo de péptidos es la magainina, que puede matar a *Paramecium caudatum*, la catelicidina capaz de matar a *Caenorhabditis elegans* formando poros en la membrana celular, la cecropina sintética eficaz contra el parásito *Leishmania*.

Clasificación según la estructura tridimensional

Con base en este criterio los PAMs se clasifican en 4 familias: α , β , $\alpha\beta$ y no $\alpha\beta$ (Figura 9.2 a-d) de acuerdo a los tipos de estructuras tridimensionales que presentan. La familia α consiste de PAMs con estructuras helicoidales (por ejemplo, magaininas y LL-37). La familia β está compuesta por PAMs con estructuras de cadenas β (por ejemplo, alfa defensinas humanas). Por su parte la familia $\alpha\beta$ comprende las estructuras tridimensionales antes mencionadas (helicoidales y β plegadas), unos ejemplos de esta familia son las beta defensinas. La familia no $\alpha\beta$ (no alfa beta) no contiene cadenas helicoidales ni beta (por ejemplo, la indolicidina).

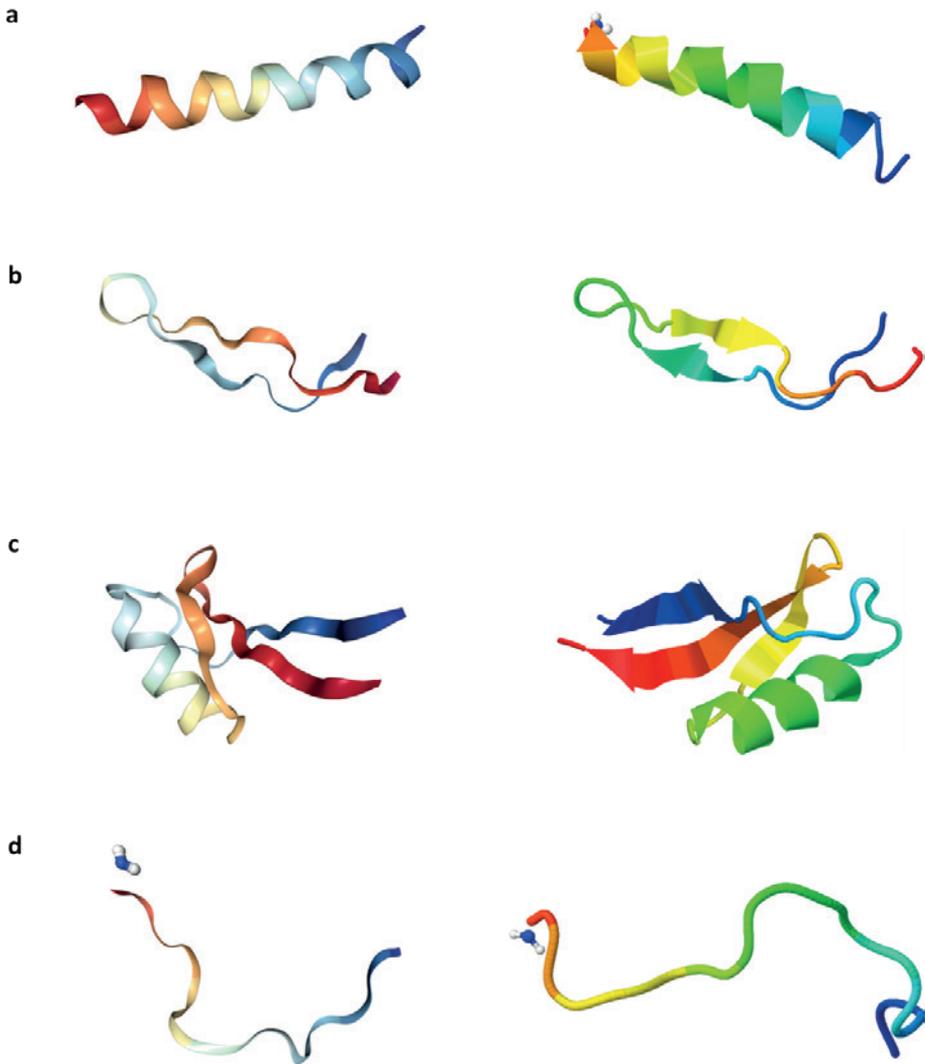


Figura 9.2. Estructuras tridimensionales de PAMs representativos de cada familia.

a) Familia α . Magainina 2 de la rana *Xenopus laevis* (Acceso PDB: 2MAG). b) Familia β . Lactoferricina B del bovino *Bos taurus* (Acceso PDB: 1LFC). c) Familia $\alpha\beta$. Defensina vegetal Psd1 de *Pisum sativum* (Acceso PDB: 1JKZ). d) Familia no $\alpha\beta$. Indolicidina bovina de *Bos taurus* (Acceso PDB: 1G89).

Clasificación según sus objetivos moleculares

Los PAMs pueden clasificarse ampliamente en dos familias: péptidos cuyo objetivo es la superficie celular (por ejemplo, nisinas y temporinas) y péptidos con objetivos intracelulares (como péptidos ricos en Prolina). Los péptidos dirigidos a la superficie celular incluyen tanto péptidos dirigidos a membrana como no dirigidos a membrana y pueden incluso subdividirse más según los objetivos específicos como pared celular/ carbohidratos, lípidos / membranas y proteínas / receptores. Del mismo modo, los PAMs con objetivos intracelulares pueden clasificarse adicionalmente con base a las moléculas diana específicas, por ejemplo, proteínas, DNA y RNA.

Mecanismos de acción de PAMs

La capacidad de los PAMs para eliminar bacterias generalmente depende de su capacidad para interactuar con las membranas bacterianas o las paredes celulares. Generalmente, los PAMs muestran una carga neta positiva y una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, lo que les permite unirse selectivamente a las membranas bacterianas cargadas negativamente. La unión de los PAMs a la membrana bacteriana conduce a una alteración no enzimática. La selectividad para especies específicas se debe a diferencias en la composición de la membrana de diferentes microbios y tipos de células.

PAMs dirigidos a membrana celular

Los mecanismos dirigidos a la membrana se pueden describir a través de los modelos de poste y alfombra, y el modelo de poste se puede dividir en modelos de poro toroidal y de duela de barril (Fig. 9.3).

Modelo de poro toroidal

El modelo de poro toroidal también se conoce como modelo de agujero de gusano. En este modelo, los PAMs incrustados verticalmente en la membrana celular se acumulan y luego se doblan para formar un agujero anular con un

diámetro de 1 a 2 nm. Los ejemplos típicos de este modelo son magainin 2, lacticin Q y arenicin.

Modelo de duela de barril

Los péptidos antimicrobianos se agregan entre sí, penetran la bicapa de la membrana celular en forma de multímeros y forman canales que dan como resultado el flujo de salida citoplásmico. En casos severos, los PAMs pueden inducir el colapso de la membrana celular y provocar la muerte celular.

Modelo tipo alfombra

Los PAMs se disponen paralelos a la membrana celular. Su extremo hidrofílico se perfila hacia la solución y su extremo hidrofóbico hacia la bicapa de fosfolípidos. Los PAMs cubren la superficie de la membrana de manera similar a una alfombra y destruyen la membrana celular de una manera similar a un “detergente”. Sin embargo, este mecanismo de formación de poros requiere un cierto umbral de concentración y la concentración requerida de PAM es alta.

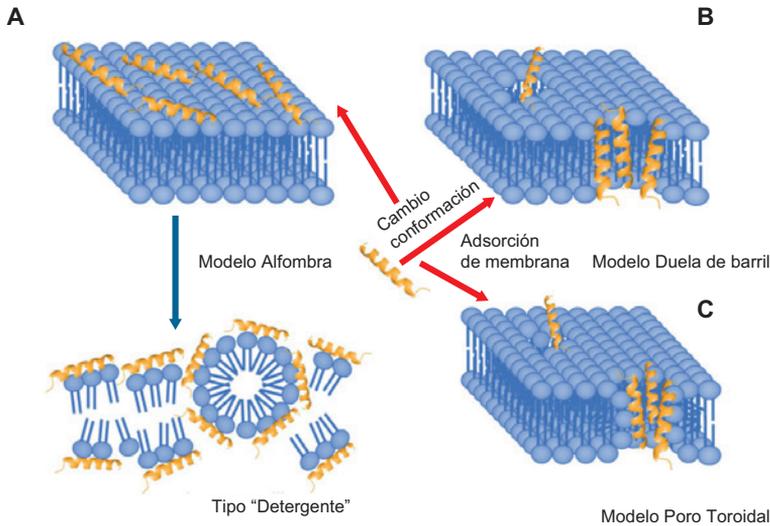


Figura 9.3. Modelos de mecanismos de acción para la actividad de PAMs a nivel extracelular. (A) Modelo de alfombra; (B) Modelo de duela de barril y (C) Modelo de poro toroidal.

Mecanismo de direccionamiento sin membrana

La forma en que los PAMs ingresan a las células es por penetración directa o endocitosis. Después de ingresar al citoplasma, los PAMs identificarán y actuarán sobre el objetivo. Según el objetivo, los PAMs se pueden dividir en las siguientes categorías.

Inhibición de la biosíntesis de proteínas

Los PAMs afectan la transcripción, traducción y ensamblaje en péptidos funcionales a través del plegamiento de chaperonas moleculares al interferir con enzimas relacionadas y moléculas efectoras. Por ejemplo, Bac7 1–35 se dirige a los ribosomas para inhibir la traducción de proteínas, mientras que Tur1A inhibe la síntesis de proteínas en *E. coli* y *Thermus thermophilus* al inhibir la transición de la fase inicial a la fase de extensión.

Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos

Los PAMs pueden afectar enzimas clave o inducir la degradación de moléculas que participan en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. La indolicidina, un PAM catiónico rico en triptófano (Trp) con 13 aminoácidos, se dirige específicamente al sitio básico del DNA, sitio importante de entrecruzamiento del DNA de una o dos cadenas y también puede inhibir la topoisomerasa I del DNA.

Inhibición de la actividad de proteasas

Muchos PAMs pueden inhibir varias actividades metabólicas al inhibir la actividad de proteasas. Un ejemplo es la histatina 5 que tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre las proteasas secretadas por el huésped y las bacterias. Los PAMs eNAP-2 e indolicidina inhiben las serin proteasas microbianas, la elastasa y la quimotripsina. La catelicidina-BF es un péptido aislado del veneno de *Bungarus fasciatus* que puede inhibir eficazmente la agregación plaquetaria inducida por trombina y bloquear aún más el receptor 4 activado por proteasas.

Inhibición de la división celular

Algunos PAMs impiden la división celular al inhibir la replicación del DNA y la respuesta al daño del DNA (respuesta SOS), ya sea bloqueando el ciclo celular o provocando la falla de la separación cromosómica. Por ejemplo, el péptido APP es un PAM con 20 residuos de aminoácidos, que puede eliminar de manera eficiente a *Candida albicans* debido a su eficiencia de penetración celular, fuerte afinidad de unión al DNA y capacidad para inducir la detención de la fase "S" en el entorno intracelular. Por otra parte, el péptido MciZ, contiene 40 residuos y es un inhibidor eficaz de la división celular bacteriana, la formación del anillo Z y la localización.

Tecnología del DNA recombinante para la producción de PAMs

Como se mencionó, los PAMs son antibióticos peptídicos endógenos que forman parte importante del sistema inmunitario innato de los seres vivos, y tienen dos propiedades atractivas. La primera es que poseen una amplia gama de actividades antimicrobianas, y la segunda, es que se dirigen principalmente a las membranas microbianas, lo que impide la capacidad de los microbios para desarrollar resistencia contra ellas. Estas dos propiedades las posiciona como candidatos prometedores para nuevos antibióticos. Sin embargo, se deben abordar una serie de cuestiones fundamentales, como los mecanismos, la eficacia y la seguridad, antes de que los péptidos puedan pasar a una etapa de ensayos clínicos. Responder a estas preguntas requiere rigurosos estudios funcionales y estructurales, cuyo éxito depende en gran parte de la disponibilidad de péptidos puros. No obstante, el aislamiento a partir de fuentes naturales es un proceso laborioso y lento, y por lo tanto no proporciona un método eficaz para obtener péptidos en grandes cantidades. La síntesis química, aunque muy eficiente, es un proceso complejo y costoso. Por lo tanto, tampoco es una vía ideal para la producción de péptidos a gran escala.

Afortunadamente, la tecnología del DNA recombinante proporciona un medio económico para la producción de proteínas, péptidos o enzimas. En comparación con la síntesis química, la expresión recombinante es escalable, barata y puede producir PAMs más grandes que contienen más de 30 aminoácidos. Esta tecnología muestra ventajas no solo en cuanto a tiempo reducido y

protocolos bien establecidos, sino también costos de producción reducidos y fácil ampliación. Los genes que expresan la proteína/péptido diana se clonan en vectores específicos para su producción en sistemas de expresión en células huésped. Las bacterias y las levaduras son los sistemas huésped más utilizados para la expresión de productos recombinantes. También en el caso de los PAMs, se ha informado que estos dos huéspedes de expresión producen más del 95 % de los PAMs expresados heterológamente. A continuación, se mencionan algunos de estos huéspedes utilizados para la producción de PAMs por vía recombinante.

Sistemas de expresión procariota (*Escherichia coli*)

E. coli es el huésped más utilizado para la producción de PAMs, particularmente la cepa *E. coli* BL21 (DE3), ha sido la más utilizada. La elección de *E. coli* como hospedero ideal se atribuye a su rápida tasa de crecimiento, a la obtención de mayores rendimientos, a la existencia de protocolos de expresión bien establecidos, a la gran disponibilidad comercial de vectores de expresión y a su rentabilidad. Otros sistemas bacterianos como *Bacillus subtilis* también se han utilizado como huéspedes para la expresión de PAMs, pero no en la misma medida que *E. coli*. A pesar de que esta bacteria es la más utilizada como plataforma procariota tiene algunas complicaciones en la producción de PAMs, como lo es que la expresión de la proteína sea de potencial letalidad hacia la propia bacteria productora. Aunado a lo anterior, la gran mayoría de los PAMs tienen una carga catiónica y, por lo tanto, son susceptibles a la degradación por proteasas endógenas. Una estrategia que supera con eficacia ambos obstáculos es fusionar el péptido de interés con una proteína transportadora o proteína de fusión. Las proteínas fusionadas pueden enmascarar la actividad de los PAMs y, por lo tanto, reducir su toxicidad hacia el huésped y la protección de los PAMs de la posible escisión proteolítica. Estas proteínas de fusión también aumentan la solubilidad de los PAMs expresados y facilitan su recuperación y aislamiento. Sin embargo, esta estrategia conduce a niveles bajos de expresión de proteínas, del orden de 10 a 30 mg/L⁻¹ (proteínas de fusión) y de 1 a 5 mg/L⁻¹ (péptidos). Las proteínas de fusión más comunes que se han utilizado para expresar y purificar PAMs incluyen tiorredoxina, pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO), glutatión S-transferasa (GST), una proteína transportadora de carboxilo de biotina (BCCP), proteína fluo-

rescente verde (GFP), etc. Una vez producido el PAM de interés fusionado a la proteína transportadora el péptido diana puede liberarse de la fusión en una etapa posterior mediante escisión enzimática o química en el sitio correspondiente alrededor de la unión del péptido portador.

Sistemas de expresión eucariota

Pichia pastoris

Una alternativa viable al uso de células bacterianas como huéspedes para la expresión heteróloga de PAMs es el uso de levaduras para producir estos agentes, ya que estos organismos tienen la ventaja de ser resistentes a la destrucción mediada por PAMs. Las levaduras, células fúngicas eucarióticas y unicelulares, también se utilizan para la producción de proteínas recombinantes que no son bien plegadas en *E. coli* debido a problemas de plegamiento o a modificaciones postraduccionales que *E. coli* es incapaz de realizar. Particularmente la especie *Pichia pastoris*, puede secretar los péptidos al medio de manera eficiente para aumentar los títulos de proteína y eliminar posteriores procesos de purificación. Esta levadura tiene ventajas sobre los procariotas tradicionales y sistemas de expresión de mamíferos, dichas ventajas son: limita la secreción de proteínas de la célula huésped pero es capaz de secretar grandes cantidades de proteínas recombinantes heterólogas, lo que reduce significativamente la carga de la purificación posterior; su tasa de crecimiento es más rápida que la de los huéspedes mamíferos, como las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293); puede crecer fácilmente en medios económicos; posee un promotor inducible endógeno de alcohol oxidasa 1 (AOX1); produce cultivos libres de endotoxinas y virus por lo que se considera no toxigénico y no patógeno, por lo que Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha aprobado varios productos preparados con ayuda de este organismo, y estos productos son generalmente aceptados como sustancias seguras (GRAS).

Plantas

La expresión recombinante de PAMs en bacterias y levaduras se asocia con limitaciones como la potencial inhibición del crecimiento o muerte mediada por PAMs en el huésped, la inestabilidad del péptido, pero sobre todo por la incapacidad de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales correctas. Si bien el uso de proteínas de fusión, como se mencionó anteriormente, hasta cierto punto resuelven las limitaciones, no garantizan la correcta síntesis de las proteínas recombinantes producidas. Por su parte, las plataformas de expresión como las plantas también se han utilizado para la producción de PAMs en las últimas décadas.

La expresión de PAMs en plantas tiene una doble intención, por una parte, su actividad antimicrobiana ayuda en la protección de las plantas y, al mismo tiempo, satisface la demanda de nuevos agentes antimicrobianos en la industria biofarmacéutica. El proceso de utilizar plantas y cultivos de células vegetales como una plataforma de producción eficaz para proteínas recombinantes con importancia industrial o farmacéutica se denomina agricultura molecular. Los avances en ingeniería genética han permitido la creación de plantas transgénicas con la ayuda de diferentes técnicas de transformación como el bombardeo con micro proyectiles o biobalística, la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada con polietilenglicol etc. Se prefiere el uso de plantas superiores debido a los menores costos de producción involucrados; el fácil manejo y el potencial escalamiento; mayor seguridad en comparación con células bacterianas o de mamíferos, ya que el riesgo de contaminación durante los procesos de fabricación es bajo y no presentan amenazas graves para la bioseguridad; y una mayor estabilidad en comparación con los animales transgénicos. Además, las plantas superiores generalmente sintetizan proteínas con plegamiento correcto y modificaciones postraduccionales precisas, lo que conduce a productos biológicamente activos. Además, las nuevas proteínas recombinantes se acumulan fácilmente en los organelos de las células vegetales como el retículo endoplásmico, las vacuolas y los plastidios protegidos de la actividad de las proteasas. El tabaco (*Nicotiana sp.*) es una de las plataformas de producción basadas en hojas más exploradas para la expresión de proteínas recombinantes. Una ventaja importante del uso del tabaco como sistema de producción de plantas es el alto volumen de biomasa que se puede producir con solo unos pocos pasos

de procesamiento. También se dice que este sistema de expresión es muy susceptible a la manipulación genética, junto con protocolos de transformación y regeneración bien establecidos. También se han identificado otros sistemas de expresión entre vegetales (papa, tomate), frutas (cítricos, plátano) y cereales (arroz, trigo). Se han reportado la producción vía recombinante de numerosos PAMs en diversas plantas (Tabla 9.2).

Tabla 9.2. Algunos péptidos antimicrobianos producidos por vía recombinante en plantas

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	MSI-99 (Magainina)	Estable	Cloroplasto	No definido	Mayor resistencia a bacterias fitopatógenas (<i>Pseudomonas syringae</i>) y hongos (<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Fusarium moniliforme</i> ; <i>Verticillium dahlia</i>)
	MsrA2 (Dermaseptina)	Estable	Núcleo	6–7 µg/g PF	Resistencia a hongos fitopatógenos (<i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Esclerotinia sclerotiorum</i>), oomicetos (<i>Pythium aphanidermatum</i>) y bacterias (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)
	Retrociclina-101 (Defensina)	Estable	Cloroplasto	32–38% Proteína total soluble	Controlar infecciones virales (virus del mosaico del tabaco) y bacterianas (<i>Erwinia carotovora</i>)
	Protegrina-1 (Cathelicidina)	Estable	Cloroplasto	17–26% Proteína total soluble	Controlar infecciones bacterianas (<i>Erwinia carotovora</i>)
	Lactoferricin B (Lactoferrin)	Estable	Núcleo	No definido	Mayor tolerancia a enfermedades bacterianas patógenas (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>) y fúngicas (<i>Botrytis cinerea</i>)

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	SP1-1 (diseño <i>de novo</i>)	Transitoria	Núcleo	0.025 mg/g PF	Actividad antimicrobiana (<i>P. syringae</i> pv. <i>Syringae</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomate</i> ; <i>P. corrugate</i> ; <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>)
	Colicinas Recombinantes (Colicina)	Transitoria	Núcleo	0.6–3 mg/g PF	Control efectivo y amplio de cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> transmitidas por los alimentos
	PaeM4 (Pyocin)	Transitoria	Núcleo	800 µg/g PF	Amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	MsrA2 (Dermaseptina)	Estable	Núcleo	1–5 µg/g PF	Resistencia amplia y mejorada a hongos fitopatógenos virulentos (<i>Alternaria</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> ; <i>Verticillium</i> sp.) y bacterias (<i>Erwinia carotovora</i>)
	pro-SmAMP2 (Péptido tipo Heveina)	Estable	Núcleo	No definido	Protección de cultivos de papa resistente a <i>Alternaria</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Thi2.1 (Thionina)	Estable	Núcleo	No definido	Protección de cultivos (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ; <i>R. solanacearum</i> cepa Pss4)
	CecB (Cecropin)	Estable	Núcleo	0.001 µg/mg PF	Protección vegetal contra patógenos bacterianos (<i>Ralstonia solanacearum</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i>)
	Snakin-2 (Snakin)	Estable	Núcleo	No definido	Mayor resistencia a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
	LL-37 (Cathelicidina)	Estable	Núcleo	16.8–58.2 µg/mL Proteína total soluble	Actividad antibacteriana mejorada (<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>Carotovorum</i> (Pcc); <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i> (Xcv))

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Mj-AMP2 (Knottina)	Estable	Núcleo	0.32–0.38% Proteína total	Mayor resistencia al patógeno fúngico (<i>Magnaporthe oryzae</i>)
	Dm-AMP1 (Defensina)	Estable	Núcleo	0.43–0.57% Proteína total soluble	Mayor resistencia a patógenos (<i>Magnaporthe oryzae</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>)
	rLF (Lactoferrina)	Estable	Núcleo	0,1% peso de salvado de arroz	Aditivo funcional para lechones destetados prematuramente
	Rs-AFP2 (Defensina)	Estable	Núcleo	0.45–0.53% Proteína total soluble	Mayor resistencia a patógenos fúngicos (<i>Magnaporthe oryzae</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>)
	Lactostatina (Péptido aniónico)	Estable	Núcleo	2 mg/g semilla seca	Fármaco anti hipercolesterolémico para uso clínico potencial
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	ChIFN-alpha (interferón- α)	Transitoria	Núcleo	0.393 μ g/kg PF	Actividad antiviral contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV)
Canola (<i>Brassica napus</i>)	PmAMP1 (Proteína rica en cisteína)	Estable	Núcleo	No definido	Resistencia efectiva contra patógenos fúngicos (<i>Alternaria brassicae</i> ; <i>Leptosphaeria maculans</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	SN-1 (Snakina)	Estable	Núcleo	No definido	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> y mayor resistencia a hongos (<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>)
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Thanatina (S) (thanatin sintética)	Estable	Núcleo	No definido	Resistencia adquirida a patógenos bacterianos (<i>Pseudomonas syringae pv. tomatate</i>) y patógenos fúngicos (<i>Botrytis cinerea</i> ; oidio) Actividad antibacteriana y antifúngica <i>in vitro</i>
Fruta cítrica (<i>Carrizo citrange</i>)	D2A21 (Péptido sintético)	Estable	Núcleo	No definido	Reducción del desarrollo de la enfermedad del cancro causada por la bacteria (<i>Xanthomonas citri</i>)

Algunas estrategias para la predicción, diseño y producción de PAMs

Análisis bioinformático. ¿Cómo buscar PAMs candidatos?

Predicción in silico

Una estrategia para la identificación de PAMs dentro de secuencias proteicas previamente reportadas es mediante herramientas bioinformáticas. Generalmente estas predicciones bioinformáticas o *in silico* toman en cuenta parámetros como la similitud con otros péptidos previamente identificados, reportados y almacenados en bases de datos.

En el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se ha trabajado con la identificación *in silico* de varios péptidos con probable actividad antimicrobiana, las plataformas bioinformáticas resultan relevantes para la identificación de PAMs, además de considerarse como punto de partida para la modificación o diseño de genes sintéticos con actividad contra un amplio número de microorganismos.

Un ejemplo es la proteína de la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente (α NAC) de *Sorghum bicolor* que tiene múltiples funciones entre las que destaca la de proteger a los polipéptidos recién sintetizados y trasladarlos al retículo endoplásmico y mitocondrias, además de actuar como proteínas chaperonas.

Para la identificación *in silico* de PAMs en α NAC se utilizó la plataforma del Sistema de escaneo de secuencias antimicrobianas o AmpA por sus siglas en inglés (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) y la plataforma Anti Bacterial Peptides Server (AntiBP) (<http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/>). Se identificaron dos probables péptidos con acción antimicrobiana, no obstante, para corroborar esta actividad se analizaron en otras plataformas, en la Database of antimicrobial activity and structure of peptides (DBAASP) (<https://dbaasp.org/prediction>), en la Antimicrobial Peptide Scanner v1.2, y en la Collection of Anti-microbial Peptides (CAMPr3) (camp.bicnirrh.res.in).

Para determinar el grado presuntivo de actividad antimicrobiana se utiliza el modelo de árbol de decisión creado a partir del algoritmo j48 que se basa en propiedades fisicoquímicas descritas en otros péptidos antimicrobianos disponibles en bases de datos como Antimicrobial Peptide Database (APD).

Las predicciones de la actividad antimicrobiana de los dos péptidos fueron estimadas en la plataforma Database of antimicrobial activity and structure of peptides (DBAASP).

Los dos péptidos con presunta actividad antimicrobiana se muestran en la Figura 9.4; donde se muestra la secuencia de aminoácidos de α NAC y en color gris oscuro y gris claro señalados los PAMs. El péptido KSRKAMKLGMP tiene una mayor probabilidad de ser funcional (Tabla 9.3), todo esto con base en la predicción de las plataformas las cuales basan su decisión en similitudes con otros PAMs. En alineamientos realizados en la plataforma APD3, dio como resultado que este péptido presenta una similitud del 43.75% con un péptido sintético denominado DP1, el cual se le ha atribuido actividad anticancerígena y con un péptido denominado Histone H6 – like protein el cual se le atribuye actividad contra bacterias Gram + y Gram –.

Por otra parte, resultan de gran la utilidad las plataformas predictivas de la capacidad antimicrobiana de péptidos, como la DBAASP, ya que según el análisis realizado en esta plataforma el péptido KSRKAMKLGMP es funcional para inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis* y la lisis de eritrocitos humanos, mientras que SRVTVKKSKNMLFVI tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 9.4).

```
>XP_002445811.1 nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1
[Sorghum bicolor]
MTAQAAEELAAQIEQQKLEEQKTEAEVVVEDEDDDDDDDDKDDDELGDGHEGD
ASGKSKQSRSEKKSRKAMKLGMPITGVSrvTVKKSKNMLFVISKPDVFKSPNSDTY
VIFGEAKIEDLSSQLQTQAAEQFKAPDLSQMISKPETSGLGQEDNEEEVDETGVEAKDI
ELVMTQATVSRRAKAVKALKASNGDIVTAIMELTN
```

Figura 9.4. Secuencia proteica en formato FASTA de α NAC de *S. bicolor* donde se resaltan los dos péptidos con potencial actividad antimicrobiana

Tabla 9.3. Predicción *in silico* de actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en α NAC de *Sorghum bicolor*

Péptido	DBAAS ¹	CAMPr3				AntiBP Server	Antimicrobial Peptide Scanner vr.2
		SVM ²	RFC ³	ANN ⁴	DAC ⁵		
KSRKAMLKLGMP	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
SRVTVKKSKNMLFVI	Sí	No	No	No	No	Sí	No

¹ Database of antimicrobial activity and structure of peptides

² Algoritmo máquinas de vectores de soporte (support vector machine)

³ Algoritmo de bosques aleatorios (random forest)

⁴ Algoritmo red neuronal artificial (artificial neuronal network)

⁵ Algoritmo de análisis discriminatorio (discriminant analysis)

Propiedades fisicoquímicas

Los parámetros fisicoquímicos de los péptidos identificados se calculan en plataformas como The Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) y ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

El grado de actividad se basa en las propiedades fisicoquímicas del péptido ya que a partir de ellas se puede predecir el modo de interacción con el microorganismo. De acuerdo a los resultados de la tabla 9.5, se puede concluir que ambos péptidos identificados en la proteína α NAC son de naturaleza catiónica. Generalmente todos los PAMs tienden a la carga positiva para la facilidad de interacción con los componentes negativos (fosfolípidos) de la membrana plasmática, el valor de la carga generalmente tiende a tener un valor de entre 2-9 a un pH de 7 por lo que se podría afirmar que el grado de cationicidad del péptido está estrechamente relacionado con la actividad antimicrobiana. El porcentaje de residuos hidrofóbicos en un péptido con actividad antimicrobiana se ha reportado que debe de ser mayor o igual al 30%, ambos cumplen con esta característica. Otro parámetro relevante es su peso molecular, se ha reportado que este tipo de péptidos se caracterizan por tener poca longitud y por lo tanto bajo peso molecular (menor a 10 kDa), sin embargo, la predicción del peso molecular de los péptidos predichos es mayor a los 10 kDa. En cuanto al punto isoeléctrico (pI), se define como el pH en el que la proteína/péptido tiene una carga neta cero y su valor es fundamental para la predicción de la solubilidad del péptido, entre

más parecido sea la pI del péptido al pH del solvente aumenta la tendencia a precipitarse y por lo tanto a la pérdida de su actividad biológica, los pI reportados para los péptidos con este tipo de actividad tiende a ser cercanos a 10, ambos péptidos identificados se acercan a este valor. El índice de Boman predice la facilidad de unión del péptido a la membrana o a otras proteínas, un valor alto indica la probabilidad de que el péptido sea multifuncional, que puede ejercer una amplia variedad de funciones dentro de la célula e interactuar con muchas proteínas. En cuanto al coeficiente de partición ($\log P$) es un indicador de hidrofobicidad, altos niveles de este parámetro indican baja solubilidad, en ambos péptidos tenemos presente valores negativos que indican una buena solubilidad. Con base en todos estos parámetros, se generaron algoritmos para predecir el grado de actividad antimicrobiana, por lo que el péptido KSRKAMLKLGMP podría tener una actividad media, mientras que el péptido SRVTVKKSKNMLFVI no tendría actividad antimicrobiana.

Modelado tridimensional de la estructura del péptido

La estructura tridimensional de los péptidos se obtuvo en la plataforma PEP-FOLD 3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>).

Los péptidos con actividad antimicrobiana generalmente se clasifican en cuatro grupos de acuerdo con su estructura secundaria: α , β , $\alpha\beta$, y $\text{ni-}\alpha\beta$. De acuerdo con el modelado tridimensional obtenido (Figura 9.5), el péptido de secuencia KSRKAMLKLGMP tiene una estructura terciaria de α -hélice, la cual es una estructura común dentro de los PAMs, mientras que el péptido de secuencia SRVTVKKSKNMLFVI entraría dentro de la familia β de los PAMs.

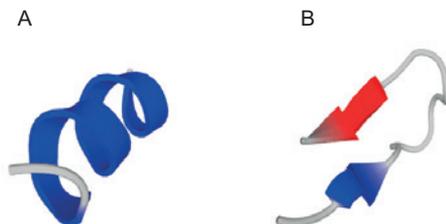


Figura 9.5. Modelado tridimensional de los péptidos con presunta actividad antimicrobiana identificados en la proteína α NAC en *S. bicolor*. A. Péptido 1: KSRKAMLKLGMP. B. Péptido 2: SRVTVKKSKNMLFVI.

Las plataformas bioinformáticas resultan relevantes para la identificación de PAMs, además de considerarse como punto de partida para la modificación o diseño de genes sintéticos con actividad contra un amplio número de microorganismos.

Tabla 9.4. Predicción *in silico* de actividad de los péptidos contra diversos microorganismos y células humanas

Proteína Péptido	SbaNAC	
	KSRKAMLKLGMPK	SRVTVKKSKNMLFVI
<i>Eritrocitos humanos</i>	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	-	-

+ péptido con actividad antimicrobiana

- péptido sin actividad antimicrobiana

Tabla 9.5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en α NAC de *Sorghum bicolor* a partir de sus características fisicoquímicas.

Proteína	Sb α NAC	
Péptido	SRVTVKKSKNMLFVI	KSRKAMLKLGMP
Formula Molecular	C79H141N21O20S1	C65H122N20O15S2
Peso Mol (Kda)	17.5	14.87
Hidrógeno	141	122
Oxígeno	20	15
Log P	-4.0	-5.1
pI	11.26	11.33
CARGA	+4	+5
Res. Hidrofóbicos	46	38
IB (kcal/mol)	1.35	1.78
Energía Drending (kJ/mol)	941.93	809.59
ASA_p	419.45	434.87
PA	Sin Actividad	Actividad Media

Log P: coeficiente de partición

pI: punto Isoeléctrico

IB: Índice Boman

ASA_P: área de superficie accesible al péptido

PA: Probable actividad

Protocolos

Protocolo 1. Diseño y producción de PAMs en E. coli; unión de amplicones a partir de PCR

De forma rutinaria se suelen diseñar oligonucleótidos que contengan sitios de restricción para amplificar fragmentos de DNA por PCR, posteriormente tanto el vector de destino como el amplicón obtenido se tratan con la enzima o enzimas de restricción para crear sitios complementarios homólogos que puedan ligarse fácilmente y obtener una "construcción", conformada por el plásmido o vector y el amplicón de interés.

A. Diseño de oligonucleótidos que incluyen sitios de restricción.

En el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se han diseñado oligonucleótidos a partir de la secuencia de la planta *Moringa oleifera* para la amplificación de 2 fragmentos que contenían PAMs de interés, como son el péptido FLO (actividad antibacteriana) y el péptido *Mo*-CBP₃ (actividad antifúngica). A los oligonucleótidos diseñados se les adicionó la secuencia correspondiente a sitios de restricción *Nco*I y *Hind*III para el caso del amplicón *Mo*-CBP₃ mientras que para FLO se añadieron los sitios *Hind*III y *Spe*I (Tabla 9.6) con la finalidad de realizar un empalme de ambos fragmentos por complementariedad de secuencias. Cada uno de los amplicones fueron clonados en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega, Fitchburg, WI) obteniendo las construcciones *Mo*-CBP₃/pGEM y FLO/pGEM.

Tabla 9.6. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de *Mo*-CBP₃ y FLO.

Especie	Fuente proteína	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos	Referencia
<i>M. oleifera</i>	<i>Mo</i> -CBP ₃ P86528.1	<i>Nco</i> I 5' CCATGG CAGCGCTTCATCCGACGACAG 3' <i>Hind</i> III 5' AAGCTT AGCTCATTGGCCGCGAGTTG 3'	289 pb	RPAIQRCQQQLRNQPRCR	Gifoni <i>et al.</i> , 2012
	FLO P24303.1	<i>Hind</i> III 5' AAGCTT TGCAGAAGCACCAACAATGG 3' <i>Spe</i> I 5' ACTAGT ACAAGCACCCATGATTTGGTA3'	210 pb	QGPGRQPDFQRCGQQLRNISPP QRCPSLRQAVQLTHQQGQVG PQQVRQMYRVASNIPST	Gassenschmidt <i>et al.</i> , 1995, Suarez <i>et al.</i> , 2003

B. Empalme de amplicones

Para lograr el empalme de ambos amplicones primero se liberó el fragmento FLO por medio de los sitios de restricción *Hind*III (adicionado a los primers) y *Sac*II (sitio del vector pGEM-T[®] Easy), a su vez la construcción *Mo*-CBP₃/pGEM fue linealizada con *Hind*III, ambos fragmentos fueron purificados utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, para luego ser ligados mediante la secuencia del sitio *Hind*III por complementariedad (Fig. 9.6). Para verificar tanto el empalme como el marco de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) se extrajo el DNA plasmídico de las clonas putativas y

fue secuenciado. Una vez corroborado el correcto empalme de ambos amplicones se liberó este fragmento para ser ligado al vector de expresión pET32.

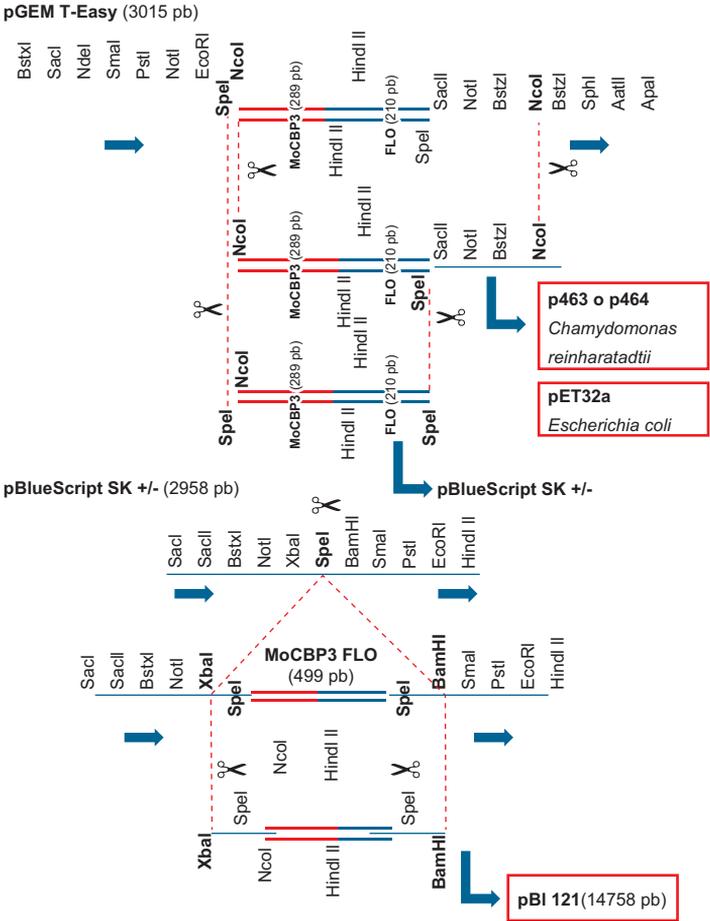


Figura 9.6. Estrategia para el empalme de amplicones de péptidos antimicrobianos en *M. oleifera*

C. Pruebas de inducción de la proteína recombinante

Con esta nueva construcción *Mo*-CBP₃-FLO/pET32 se transformó la cepa *E. coli* BL21 y se hizo crecer en medio LB líquido adicionado con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una OD600 de 0.7. Se realizaron varias réplicas del cultivo para adicionar a cada uno isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido o IPTG a concentraciones finales de 0, 0.1, 0.5 y 1 mM además, se colectaron muestras a las 2, 4, 6 y 12 horas de inducción de cada cultivo. Lo anterior se realizó para optimizar las condiciones de inducción y asegurar la obtención de la mayor expresión de la proteína recombinante.

D. Extracción de Proteínas Totales Solubles (PTS)

Una vez determinado el tiempo y concentración del inductor se escalaron los cultivos de la cepa transgénica de *E. coli* BL21. La biomasa celular se concentró por centrifugación para después ser re suspendida en un volumen de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT), se incubó la suspensión celular en hielo por 10 min y se agregaron 10 µl de del inhibidor de proteasas PMSF (100 mM) por cada mililitro de suspensión celular. Posteriormente se realizó la lisis celular mediante sonicación a 40% de amplitud durante 10 ciclos con pulsos de 10 s de lisis y 10 s de descanso, todo el proceso de lisis se realizó en frío evitando la formación de espuma. El lisado se centrifugó a 14,000 g por 10 min para después recuperar la fracción soluble y cuantificar el contenido de PTS por el método de Bradford y posteriormente ser evaluados por SDS-PAGE al 15%.

Protocolo 2. Diseño de secuencia sintética denominada gBlock

Existen varias ventajas para sintetizar el gen para una proteína de interés en lugar de depender de una fuente de DNA natural como plantilla. La síntesis directa de genes permite que la codificación de genes coincida con las preferencias del organismo huésped que se utilizará para la producción de proteínas recombinantes. En segundo lugar, cualquier sitio de restricción puede agregarse o eliminarse fácilmente durante la síntesis para facilitar la clonación, el truncamiento, la eliminación del dominio y otras alteraciones de la secuencia de longitud completa. En tercer lugar, los intentos de aumentar la expresión

mitigando el impacto de la estructura secundaria de mRNA, eliminando secuencias repetitivas y la optimización de otras características de la secuencia génica a través del diseño de secuencia se pueden incorporar fácilmente.

En el LBMP se han diseñado gBlocks codificantes para péptidos de interés, un ejemplo es el gBlock diseñado para codificar solo la secuencia madura de los péptidos de interés (Mo-CBP₃ y FLO). La síntesis y optimización de codones para su expresión en *E. coli* fue realizada por la compañía Integrated DNA Technologies (San Diego, CA). El gBlock diseñado tuvo una longitud de 269 pb, hacia el extremo 5' se agregó el sitio de restricción *NcoI* seguido del codón de inicio (ATG), luego las secuencias maduras de los péptidos Mo-CBP₃ y FLO (separadas por un codón de inicio) y hacia el extremo 3' se colocó un codón de paro (TAA) y el sitio de restricción *HindIII* (Fig. 9.7).

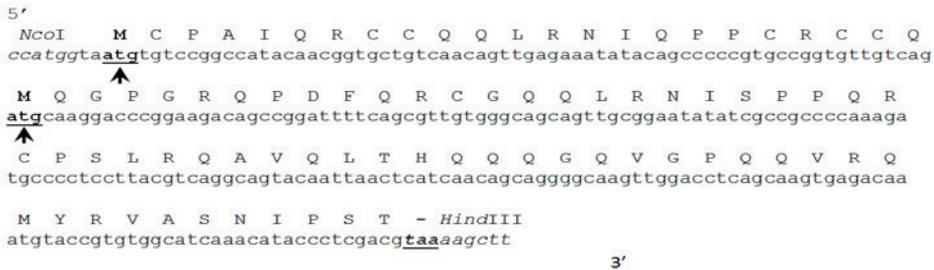


Figura 9.7. Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de gBlock. La secuencia del gBlock está flanqueada por los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* a los extremos 5' y 3' respectivamente. Resaltados en negritas se señala el codón de inicio (M), la secuencia del péptido FLO y, subrayado y en itálicas se señala el codón de paro (-).

A su vez, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gBlock (Tabla 9.7) y clonarlo al vector pGEM-T® Easy. Tanto el vector de expresión pET32 como el gBlock fueron digeridos con la enzima *EcoRI* y posteriormente purificados. Los fragmentos se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Fitchburg, WI). Con esta construcción (pET32 / gBlock) se transformaron por choque térmico células competentes de *Escherichia coli* DH5α y se seleccionaron en medio LB adicionado con ampicilina 100 mg/L. Se extrajo DNA plasmídico por el método de Birboin-Dolly y se identificaron algunas clonas con la construcción deseada mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

Las pruebas de inducción de la proteína recombinante y posterior extracción y evaluación de las proteínas producidas se realizaron conforma e lo mencionado en el apartado anterior.

Tabla 9.7. Oligonucleótidos diseñados para amplificación del gBlock.

Secuencia sintética	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos
gBlock	5' ATGTGTCGCGCCATACAACGGT 3' 5' TTACGTCGAGGGTATGTTTGATGC 3'	255 pb	RPAIQRCCQQLRNIQPRCR QGPGRQPDFQRCGQQLRNISPPQRCPSLRQAV QLTHQQGQVGPQQRQMYRVASNIPT

Bibliografía

- Arнау, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 1-13.
- Azad, M. A., Huttunen-Hennelly, H. E. K., & Friedman, C. R. (2011). Bioactivity and the first transmission electron microscopy immunogold studies of short de novo-designed antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), 2137-2145.
- Bahar A. A. & Ren D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411-421.
- Bergström, C. A., & Larsson, P. (2018). Computational prediction of drug solubility in water-based systems: qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. *International Journal of Pharmaceutics*, 540(1-2), 185-193.
- Chen, J. J., Chen, G. H., Hsu, H. C., Li, S. S., & Chen, C. S. (2004). Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2256-2261.
- Daliri, E. B., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana press.
- gBlocks Gene Fragments, s/f. Recuperado de: <https://www.idtdna.com/pages/products/genes-and-gene-fragments/double-stranded-dna-fragments/gblocks-gene-fragments>
- Gifoni J. M., Oliveira J.T.A., Oliveira H. D., Batista A. B., Pereira M.L., Gomes A. S. & Vasconcelos I. M. (2012). A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Pept Sci.* 98(4), 406-415.
- Gould, N., Hendy, O., & Papamichail, D. (2014). Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 41. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00041>
- Huang Y., Kong Q., Mou H. & Yi H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2405954. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster *de novo* structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W449-W454.
- Lira, F., Perez, P. S., Baranauskas, J. A., & Nozawa, S. R. (2013). Prediction of antimicrobial activity of synthetic peptides by a decision tree model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(10), 3156-3159.
- Muñoz-Carrillo, M. G., Valdés-Rodríguez, S. E., Garcidueñas-Piña, C. & Morales-Domínguez, J.F. (2018). Análisis de expresión de genes de respuesta al estrés hídrico en plantas de *Sorghum bicolor* (L) Moench en presencia y ausencia de asociaciones con hongos micorrízicos. Tesis Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/1601>

- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W. & Goździcka-Józefiak A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59:181-196
- Osorio, D., Rondón-Villarrea, P., & Torres, R. (2015). Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *R Journal*, 7(1).
- Pirtskhalava, M., Gabrielian, A., Cruz, P., Griggs, H. L., Squires, R. B., Hurt, D. E. & Alekseev, V. (2016). DBAASP v. 2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1104-D1112.
- Quezada-Rivera, J.J., Soria-Guerra, R.E., Vasco-Méndez, N.L. & Morales-Domínguez, J.F. (2018). Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* Lam. y *Enterococcus* sp. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/1612>
- Quezada-Rivera, J.J., Soria-Guerra, R.E., Pérez-Juárez, F.S., Martínez-González, L., Valdés-Rodríguez, S.E., Vasco-Méndez, N.L., & Morales-Domínguez, J.F. (2019). Heterologous expression of bacteriocin E-760 in *Chlamydomonas reinhardtii* and functional analysis. *PHYTON-International Journal of Experimental Botany*. 88: 25-35.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- Shanmugaraj, B., Bulaon, C. J. I., Malla, A., & Phoolcharoen, W. (2021). Biotechnological insights on the expression and production of antimicrobial peptides in plants. *Molecules*, 26(13), 4032. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26134032>
- Sneh, L., Sharma, B. K. & Raghava, G.P.S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8:263
- Suarez, M., Entenza, J. M., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marison, I., Moreillon, P. & Mermod, N. (2003). Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol Bioeng*. 81(1), 13-20.
- Torrent, M., Nogués, V. M., & Boix, E. (2009). A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. *BMC bioinformatics*, 10(1), 373.
- Varasteh-Shams, M., Nazarian-Firouzabadi, F. & Ismaili, A.J. (2020). The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant

- Dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. *Curr Plant Biol.* 24:100177.
- Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics*, 34(16), 2740-2747.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics*, 7, 285. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-285>
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P. & Idicula-Thomas, S. (2016). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1094-D1097.
- Wang, G. (2014). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Computational Peptidology*, 43-66. doi:10.1007/978-1-4939-2285-7_3
- Wang, G. (2015). Improved methods for classification, prediction and design of antimicrobial peptides. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1268, 43-66.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.
- Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. (2011). Designing genes for successful protein expression. En *Methods in Enzymology* (Vol. 498, pp 43-46): Academic Press.
- Zhao X., Wu H., Lu H., Li G. & Huang Q. (2013). LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* 8: e66557