

## Trabajo completo

# Péptido antimicrobiano quimérico de dermaseptina-s1 y tigerinina-1: Estructura secundaria y selectividad hacia membranas

RECIBIDO: 03/06/10

ACEPTADO: 12/10/10

Rudi, J. M.<sup>1</sup> • Müller, D. M.<sup>1</sup> • Siano, Á.<sup>1</sup> • Simonetta, A. C.<sup>2</sup> • Tonarelli, G. G.<sup>1 (\*)</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (U.N.L.). Ciudad Universitaria - Paraje El Pozo, C.C. 242- Santa Fe. Argentina.

<sup>2</sup> Cát. de Microbiología y Biotecnología, Dpto. de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (U.N.L.). Santiago del Estero 2829. Santa Fe. Argentina.

(\*) Correspondencia a: Georgina G. Tonarelli, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, U.N.L., C.C 242, C.P. 3000. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina.  
E-mail: tonarelli@fbc.unl.edu.ar, Tel: 54-342-4575206 int.224, Fax: 54-0342-4575221

**RESUMEN:** Se diseñó un péptido quimérico constituido por dos dominios estructurales, la región amino-terminal contiene la secuencia 1-18 de dermaseptina-s1, y la región carboxilo-terminal la secuencia completa de tigerinina-1 (TG-1, región 1- 11). El péptido híbrido presentó actividad antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Candida* sp. Análisis por Dicroísmo Circular en metanol permitieron detectar la presencia de elementos de estructura alfa-hélice y beta, los que son característicos de dermaseptina y tigerinina, respectivamente. Los ensayos de hemólisis evidenciaron

que, si bien tigerinina-1 y la región N- terminal de dermaseptina no son hemolíticas, el híbrido presenta una significativa actividad hemolítica, que resulta comparable a la reportada para péptidos antimicrobianos del género *Rana*, que contienen similares combinaciones de elementos de estructura secundaria.

**PALABRAS CLAVE:** péptidos antimicrobianos; anfibios; síntesis; estructura; selectividad

**SUMMARY:** *Chimeric antimicrobial peptide of dermaseptin -s1 and tigerinin-1. Secondary structure and selectivity toward membranes.*

It was designed a chimeric peptide

composed of two structural domains, the amino-terminal region containing the sequence 1-18 of dermaseptin-s1, and the carboxyl-terminal region the complete sequence of tigerinin-1 (TG-1, region 1-11). The hybrid peptide showed antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Candida* sp. Analysis by Circular Dichroism in methanol allowed to detect the presence of structure elements alpha-helix and beta, which are

characteristic of dermaseptin and tigerinin, respectively. Hemolysis tests showed that while tigerinin-1 and the N-terminal region of dermaseptin are not hemolytic, the hybrid has a significant hemolytic activity, which is comparable to that reported for antimicrobial peptides from the genus *Rana*, which contain similar combinations of secondary structure elements.

**KEYWORDS:** antimicrobial peptides; amphibians; synthesis; structure; selectivity

---

### Introducción

En los últimos años, el uso extensivo de los antibióticos clásicos ha determinado el surgimiento de especies bacterianas resistentes a múltiples drogas, y como consecuencia de ello ha resultado de interés creciente la búsqueda de nuevas estrategias para el control de estas infecciones.

Las especies en su proceso evolutivo, desde los insectos y hasta los mamíferos, producen péptidos antimicrobianos que actúan como una primera línea de defensa, suplementando la acción del sistema inmune humoral y celular [1,2].

La potencial actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos depende de diversos factores estructurales y de propiedades fisicoquímicas de las secuencias, tales como anfipaticidad, tamaño, carga neta e hidrofobicidad [3]. Los péptidos antimicrobianos actúan a nivel de la membrana celular de las células blanco, donde interaccionan en una primera etapa en forma electrostática, con las cabezas polares negativas de los fosfolípidos de membrana [4-6]; posteriormente estos péptidos plegados en estructuras secundarias anfipáticas interaccionan con el interior hidrofóbico de la membrana

blanco, acomodándose en forma paralela o bien adoptando una orientación transmembrana, lo que produce una alteración del potencial y del gradiente de iones, y finalmente conduce a la pérdida de material y posterior muerte celular [7].

La piel de los anfibios ha mostrado ser una fuente importante de péptidos antimicrobianos. Cerca de 400 péptidos han sido aislados de anfibios anuros, los que son sintetizados en las glándulas granulares presentes en la piel, y constituyen un componente importante en la inmunidad innata de estos animales [8,9]. Estos péptidos estarían involucrados en la defensa de la piel desnuda contra bacterias patógenas y hongos [10], ayudando además en la reparación de las heridas. Sobre la base de su secuencia y características estructurales tridimensionales se agrupan en tres familias: -péptidos lineales anfipáticos helicoidales como las magaininas y péptidos relacionados, aislados de *Xenopus laevis* [11], y las dermaseptinas, aisladas de especies del género *Phyllomedusa* [12]; -péptidos que contienen dos residuos de cisteína sobre el COOH terminal unidos mediante un puente disulfuro, formando un loop de 6 ó 7 resi-

duos aminoacídicos, y que han sido aislados de especies pertenecientes al género *Rana*, entre los que se encuentran las brevininas, gaegurinas, esculentinas, ranateurinas y ranalexina [2, 13-17];-las temporinas, aisladas de *Rana temporari*, que son los péptidos antimicrobianos más pequeños que se conocen, y contienen entre 10 y 13 residuos aminoacídicos [18].

*Rana tigrina* es el anfibio más diseminado en la India, de donde se han aislado más recientemente las tigrininas, que han demostrado ser activas hacia bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras, siendo además no hemolíticas. El extremo C-terminal tipo amida y el puente disulfuro parecen ser indispensables para su acción antimicrobiana, siendo tigrinina-1 (TG-1) el miembro más activo de esta familia [19, 20]. Estos péptidos no presentan homología secuencial con otros péptidos antimicrobianos aislados de anfibios anuros.

Las dermaseptinas son moléculas catiónicas, que permeabilizan la membrana de las bacterias Gram (+), Gram (-), levaduras y hongos filamentosos. Dentro de esta familia se encuentra dermaseptina-s1, que es un péptido antimicrobiano constituido por 34 residuos aminoacídicos [12]. Se ha demostrado que su actividad antimicrobiana se centra sobre la región N-terminal (residuos 1-18), la cual adopta una conformación de  $\alpha$ -hélice anfipática [21].

Desafortunadamente, el estudio de sinergismo entre péptidos antimicrobianos no es un tema sencillo de abordar, por el hecho de que los péptidos pueden interaccionar formando complejos multipéptidos y por lo tanto, al mismo tiempo, se podría estar evaluando el efecto de los péptidos individuales y el de sus propias interacciones sinérgicas. La síntesis de péptidos híbridos (o quiméricos), donde se combinan secuencias fun-

cionales de péptidos antimicrobianos diferentes en una misma cadena polipeptídica, es una alternativa que permite generar nuevas moléculas con mayor actividad.

En este sentido, se ha demostrado que un péptido quimérico formado por un inhibidor de la patogénesis de *Staphylococcus aureus* (RNAIII péptido inhibidor) y un derivado de dermaseptina erradica en forma completa las infecciones estafilocócicas en una forma mucho más efectiva que los péptidos individuales que lo componen. La mayor actividad del péptido quimérico se ha atribuido a los propios mecanismos de cada péptido componente, actuando simultáneamente sobre la bacteria [22].

Otros ejemplos interesantes son los híbridos de cecropina y melitina, que presentan mayor actividad antimicrobiana, y menor actividad hemolítica que melitina por sí sola [23, 24].

En el presente trabajo se planteó el diseño de un péptido quimérico, constituido por la región N-terminal de dermaseptina-s1 (residuos 1-18) y la secuencia completa de tigrinina -1 (residuos 1-11). De este modo, el híbrido presentaría dos dominios estructurales bien definidos, una región N-terminal tipo  $\alpha$ -hélice y una región C-terminal con estructura tipo beta, los que también aparecen en péptidos antimicrobianos aislados de especies del género *Rana*.

Los estudios estuvieron orientados a: -determinar si el híbrido dermaseptina-tigrinina mostraba la combinación de estructuras secundarias propia de sus partes constitutivas; -realizar un screening de actividad antimicrobiana; -evaluar su selectividad hacia membranas, partiendo de la base de que sus partes carecen de actividad hemolítica significativa, según los datos reportados por otros autores y los avalados por nuestros propios resultados.

## Materiales y métodos

### Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados mediante la química Fmoc (9-fluorenil-metiloxi-carbonilo) en fase sólida, como péptidos C-terminal carboxamida, según las secuencias reportadas en la bibliografía para tigerina-1 y región N-terminal de dermaseptina-

s1 [19, 21]. El péptido híbrido, identificado como DS-S1(1-18)-TG-1, contiene en su región N-terminal la secuencia 1-18 de dermaseptina-s1, a la que se une la secuencia de tigerina-1 (TG-1). Las secuencias sintetizadas y la comparación de algunas propiedades fisicoquímicas, en relación con dermaseptina s-1 se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Secuencia del péptido híbrido (DS-S1 (1-18)-TG-1) y de sus partes constitutivas. Comparación de la hidrofiliidad y carga de las secuencias, en relación con dermaseptina s1.

Identificación	Secuencia	Hidrofiliidad <sup>(1)</sup>	%AA. hidrofílicos <sup>(2)</sup>	Carga a pH=7.0
DS-s1 (1-18)-TG-1 (*)	ALWKTMLKKGLTMA LHAGFCTMIPIRCY-amida	0.60	14 %	+5
TG-1(*)	FCTMIPIRCY-amida	-0.80	9%	+1.9
Región 1-18 dermaseptina s1	ALWKTMLKKGLTMA LHAG-amida	-0.40	17 %	+4.1
dermaseptina s1 (1-34)	ALWKTMLKKGLTMALHAG KAALGAAADTISQGTQ-amida	-0.20	24 %.	+4.1
Región 19-34 de dermaseptina s1	Ac-KAALGAAADTISQGTQ. -amida	0.00	31 %	0.0

(\*) las secuencias corresponden a los péptidos sintetizados.

<sup>(1)</sup> hidrofiliidad promedio según Hoop y Woods

<sup>(2)</sup> relación aminoácidos hidrofílicos/ número total de aminoácidos

Se emplearon los siguientes Fmoc-derivados para los aminoácidos trifuncionales: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-Lys(Boc)-OH (CalBiochem-NovaBiochem Corp. California, USA y Sigma Chemical Co, USA). Como soporte sólido se utilizó la resina Rink Amida MBHA (4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidonorleucil)-MBHA-resina de Novabiochem, USA. Los acoplamientos se realizaron con PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tris-pirrolidinio-fosfonio) en presen-

cia de N-metilmorfolina (3% en N,N-dimetilformamida, DMF), y las desprotecciones se realizaron con piperidina al 20% (v/v) en DMF. Todos los solventes usados fueron de calidad HPLC. El monitoreo de las reacciones se realizó por los métodos convencionales para este tipo de síntesis. El péptido fue desprotegido y simultáneamente separado de la resina empleando una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), etanoditiol (EDT), agua y triisopropilsilano (TIS) en las siguientes proporciones: TFA(94.5)/EDT(2.5)/H<sub>2</sub>O(2.5)/TIS(0.5) (v/v). El producto de síntesis fue separado de la mezcla de reacción por pre-

cipitación con éter etílico a 4°C, y posterior centrifugación y liofilización.

Las versiones cíclicas de TG-1 y del híbrido se obtuvieron mediante oxidación al aire de los residuos de cisteína, empleando metodologías ya optimizadas por el grupo de trabajo [25]. Se emplearon soluciones de péptidos de una concentración de 0.1 mg/mL en buffer bicarbonato de amonio 0.1M (pH 8), con el agregado de metanol para favorecer la solubilización. Las soluciones conteniendo los péptidos ciclados fueron concentradas al vacío y posteriormente liofilizadas y conservadas a -20°C, hasta su utilización.

#### *Purificación y caracterización de los productos de síntesis*

Los productos de síntesis fueron analizados por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), en un equipo analítico-semipreparativo marca Gilson (USA) con detector UV-Vis. Para la purificación se empleó una columna Vydac C18 (250 x 10 mm, 300 Å, 10 µ), equilibrada con dos sistemas solventes: (A) H<sub>2</sub>O con 0.1% TFA y (B) acetonitrilo (ACN) conteniendo 0.1% TFA. Se utilizó el siguiente programa de gradientes: 5-80 % B, en 50 min; velocidad de flujo 2 mL/min; volumen de inyección 1 mL; detección UV a 220 nm. Para el análisis de pureza se empleó una columna analítica de C<sub>18</sub> (Delta Pak, 150 x 3,9 mm, 300 Å, 5 µ, Waters), y un gradiente de elución similar al descrito anteriormente.

#### *Ensayos de actividad antimicrobiana Cepas indicadoras*

Se utilizaron las siguientes cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-) y de levaduras, como indicadores de la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados: *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9, *Bacillus subtilis* DBFIQ

B 11, *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, *Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55, *Micrococcus luteus* DBFIQ M 2, *Enterococcus faecalis* DBFIQ E 24, *Saccharomyces cerevisiae* DBFIQ Sc 5, *Candida* sp. DBFIQ C 1 y *Candida* sp. DBFIQ C 22, todas pertenecientes a la colección de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Todas las cepas fueron conservadas por liofilización y por congelamiento a -20 y -80°C. Para la conservación por congelamiento se emplearon los medios de cultivo más adecuados para cada cepa, con el agregado de un 15 % (v/v) de glicerol, como agente crioprotector.

#### *Condiciones de Cultivo*

Las bacterias indicadoras fueron propagadas en Agar Nutritivo (Biokar), a excepción de *E. faecalis* DBFIQ E 24, que se cultivó en Agar M17 (Biokar). En ambos casos las propagaciones se efectuaron durante 12-16 h a 37°C. Las levaduras fueron desarrolladas en Agar Malta (Merck), a 30°C y también durante 12-16 h.

#### *Ensayo de difusión en agar*

Para detectar la actividad antimicrobiana se usó el ensayo de difusión en agar [26]. Se agregó 1 mL del cultivo de 12-16 h de cada cepa indicadora a 19 mL de Agar Nutritivo (Difco), vertiéndolos luego en una placa de Petri estéril. Después de solidificar a temperatura ambiente, se realizaron pozos de 7 mm de diámetro en las placas, y se colocaron en ellos 80 µL de las soluciones de los péptidos en una concentración de 1 mg/mL, con sus pH estandarizados en un valor igual a 5. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C para las bacterias blanco, y a 30°C para las cepas de levaduras, y luego se midieron los

diámetros correspondientes a los halos de inhibición. Cada ensayo fue realizado por triplicado, y los resultados se expresaron como el promedio de los valores medidos.

#### *Determinación de la actividad hemolítica*

La actividad hemolítica se evaluó frente a eritrocitos humanos, aislados a partir de un pool de sangre fresca. Las muestras de sangre se lavaron 3 veces con solución fisiológica, separando los eritrocitos por centrifugación. El pool obtenido se diluyó 1/50 para obtener una concentración de aproximadamente  $10^5$  células/mL. Se agregaron alícuotas de 0,5 mL de la suspensión diluida de células a 1 mL de las soluciones de péptidos, en el rango de concentraciones entre 25 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , y se incubaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , con agitación. Se realizó un blanco de reacción con solución fisiológica y un ensayo testigo (100% de hemólisis) con una solución de Tritón X-100 al 1%. La cantidad de hemoglobina liberada se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm, en un espectrofotómetro UV-Visible Metro-lab 1700.

#### *Dicroísmo Circular*

Los espectros de Dicroísmo Circular (DC) fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japón), en el rango de longitudes de onda de 190 a 250 nm, a  $25^\circ\text{C}$ , empleando una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Se utilizaron soluciones acuosas de TG-1, en una concentración de 0,8 mg/mL, y de DS-S1(1-18)-TG-1, en una concentración de 0,1 mg/mL (acuosa y en metanol). Todos los espectros fueron obtenidos luego de la acumulación de los datos correspondientes a 16 ensayos. La deconvolución de los espectros se realizó empleando el programa Self Consistent Method 2 (SELCON 2), desarrollado por

Sreerama y Woody, que permite determinar las fracciones de estructura secundaria en las distintas secuencias [27, 28].

#### **Resultados y discusión**

Luego de su purificación, las versiones lineales de TG-1 y DS-S1(1-18)-TG-1 fueron analizadas por Espectrometría de Masas Maldi-Tof. Para TG-1, el PM experimental fue 1342,71 m/z, coincidente con el PM calculado; para DS-S1(1-18)-TG-1, el PM experimental y el calculado corresponden a 3296,54 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  y a 3295.2 m/z, respectivamente, para la versión lineal (-SH libres). Las ciclizaciones se completaron en 14 horas.

#### *Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos*

El análogo TG-1 sólo presentó acción inhibitoria a pH 5.0 frente a *Bacillus subtilis* DBFIQ B 11, siendo ésta mayor para la versión cíclica (Tabla 2). En contraposición a estos resultados, otros autores han reportado que TG-1 presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana incluyendo cepas de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*, *Pseudomonas putida* y *S. cerevisiae* [20], en concentraciones inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Estas diferencias pueden relacionarse con que las cepas utilizadas en ambos estudios fueron diferentes, y con el hecho de que las variaciones en el comportamiento de diferentes cepas de una misma especie microbiana son frecuentes.

DS-S1(1-18)-TG-1 mostró un amplio espectro de acción a pH 5.0, tanto en su versión lineal (-SH libres) como cíclica (S-S), inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram (+) y Gram (-), así como de cepas de *Candida* sp. y de *S. cerevisiae*. Únicamente no mostró actividad inhibitoria frente a *Pseu-*

**Tabla 2:** Espectro antimicrobiano de TG-1 y del péptido híbrido DS-S1 (1-18)-TG-1 a pH 5.

	TG-1 lineal	TG-1 cíclico	Híbrido lineal	Híbrido cíclico
<b>Cepas indicadoras</b>	<b>Diámetro de halos de inhibición (mm)</b>			
<i>Escherichia coli</i> DBFIQ Ec 9	-	-	8	9
<i>Staphylococcus aureus</i> DBFIQ S 21	-	-	9	9
<i>Bacillus subtilis</i> DBFIQ B 11	8	9	8	10
<i>Pseudomonas</i> sp. DBFIQ P 55	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> DBFIQ M 2	-	-	8	10
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E 24	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBFIQ Sc 5	-	-	8	8
<i>Candida</i> sp. DBFIQ C 1	-	-	8	8
<i>Candida</i> sp. DBFIQ C 22	-	-	8	8

Diámetro de los pozos: 7 mm; (-): Ausencia de halo de inhibición.

Todas las cepas pertenecen a la Colección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL).

*domonas* sp. y a *E. faecalis* (Tabla 2). A pH 7 se observó una reducción en la actividad antimicrobiana (resultados no mostrados), probablemente asociada a una reducción en la carga y un mayor estado de agregación de las cadenas polipeptídicas.

Los primeros ensayos de inhibición reportados para dermaseptina-s1(1-34) indicaron que la misma es activa frente a cepas de *Aspergillus fumigatus* y de *Arthroderma simii*, pero inactiva frente a *Bacillus subtilis* [29]. Estudios posteriores han determinado que la actividad antimicrobiana es mayor frente a *E. coli* (5 µg/mL) que frente a otras bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* (100 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* (100 µg/mL) [12, 21]. El extremo N-terminal de dermaseptina-s1 presenta acción lítica frente a bacterias, protozoos, levaduras y hongos filamentosos, en concentraciones que van desde 5 a 100 µg/mL [21]. Se considera que esta región de la molécula es incluso más activa que la molécula completa de dermaseptina-s1.

Nuestros resultados evidencian que la incorporación de la región N-terminal de dermaseptina-s1 en el híbrido permite obtener un péptido con un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Se observa también que el péptido híbrido es activo frente a *Bacillus subtilis*, en concordancia con lo determinado en este trabajo para TG-1 y lo reportado por otros autores [21].

Dermaseptina-s4 posee un comportamiento diferente a la mayoría de las dermaseptinas, caracterizándose por una alta toxicidad hacia eritrocitos [30]. Esto se ha relacionado con su alta hidrofobicidad y con un estado de elevada agregación en soluciones acuosas, el que podría ser responsable de su limitado espectro de actividad antimicrobiana. Modificaciones en las regiones hidrofóbicas y el aumento de la carga neta positiva permitieron obtener análogos con potente actividad antibacteriana y reducida actividad hemolítica [31]. Teniendo en cuenta lo reportado para dermaseptina-s4, es posible inferir que DS-S1(1-18)-TG-1 se

presente parcialmente agregado cuando está en solución acuosa, considerando que los halos de inhibición obtenidos en este trabajo no fueron indicadores de un potente efecto inhibitorio. Por lo tanto, sería aconsejable realizar un estudio sobre dosis-respuesta, a fin de constatar la incidencia del estado de agregación sobre la actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas estudiadas.

Numerosos péptidos aislados de la piel de especies de anfibios del género *Rana* presentan un loop cíclico sobre el extremo C-terminal, formado por 6 ó 7 residuos aminoácidos (conocido como Rana Box). No obstante, el rol de este motivo estructural altamente conservado no se conoce exactamente. Tanto para ranalexina [2] como para gaegurina 4 [32], el puente disulfuro no es crítico para inducir la actividad formadora de poros, mientras que para gaegurina 5 [33] el puente disulfuro es relevante para su actividad. En tanto para esculentina-1b, que presenta también un loop cíclico similar (CKIKGEC), se ha determinado que la actividad se centra en el fragmento 1-18, de naturaleza catiónica y alfa-helicoidal [14].

Como puede observarse, en los péptidos pertenecientes al género *Rana* el efecto de la linearización de las secuencias sobre la actividad antimicrobiana varía según el caso. Lo mismo ha sido demostrado para otros péptidos cíclicos antimicrobianos; por ejemplo, para análogos de bactenequina (RLCRIVIRVCR) se ha observado un comportamiento diferencial en la capacidad para inhibir bacterias Gram (+) y Gram (-) según se trate de las versiones cíclicas o lineales [34], mientras que en otros casos la presencia del ciclo resulta imprescindible para la actividad [35, 36].

En este trabajo, la ciclización de las secuencias provocó un aumento de la actividad inhibitoria frente a *Bacillus subtilis*, tanto para TG-1 como para el híbrido. También se puede observar en la Tabla 2 que la ciclización aumenta la actividad del híbrido frente a las cepas de *E. coli* y *M. luteus* ensayadas, mientras que la actividad frente a las otras cepas investigadas no se vio afectada.

#### Actividad hemolítica

Coincidiendo con estudios reportados previamente [19], no se han observado porcentajes de hemólisis importantes para TG-1, en el rango de concentraciones ensayado (100-300 ug/mL). Si bien se

**Tabla 3:** Actividad hemolítica de TG-1 y del híbrido dermaseptina-tigerinina

Concentración de péptido (µg/mL)	Porcentaje de hemólisis (%) (*)			
	TG-1-amida lineal	TG-1-amida cíclico	DS-S1 (1-18)-TG-1 lineal	DS-S1 (1-18)-TG-1 cíclico
25	-	-	84,67	82,50
50	-	-	89,33	91,17
75	-	-	91,33	93,08
100	0,08	0,67	95,08	97,75
200	1,5	5,58	96	98,75
300	2,83	9,58	100	100

(\*) la actividad hemolítica se determinó frente a eritrocitos humanos.

DS-S1 (1-18)-TG-: híbrido de dermaseptina y tigerinina; TG-1: tigerinina



observó siempre una ligera mayor capacidad de hemólisis del análogo cíclico, ésta no superó el 9,6 % cuando se empleó una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 3).

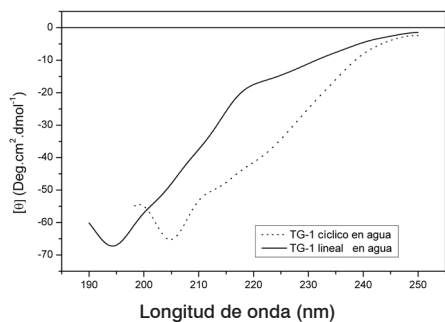
Se ha reportado que dermaseptina-s1 y la región N- terminal de la misma (residuos 1-18) no poseen actividad citotóxica significativa frente a eritrocitos de conejos ( $> 200$  y  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) [21]. Para el híbrido DS-S1(1-18)-TG-1 se observaron porcentajes de hemólisis elevados frente a eritrocitos humanos, aún en bajas concentraciones de péptido; así por ejemplo, se determinó un 80% de lisis a concentraciones de  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Al igual que con TG-1, los porcentajes fueron levemente mayores para la molécula cíclica (Tabla 3).

Dado que hemos encontrado que ambas versiones del péptido híbrido (lineal y cíclica) son hemolíticas, se estima que la falta de selectividad guarda relación con la secuencia específica del híbrido, más que con la presencia del loop cíclico. Un análisis de la secuencia permite inferir que la región 10-25 presenta una elevada hidrofobicidad, siendo éste un factor que podría determinar la falta de selectividad del híbrido. Por HPLC se determinaron, para las versiones lineal y cíclica de TG-1, tiempos de retención (tr) de 22.9 y 25.01 min respectivamente, mientras que para el híbrido, los tr de las versiones lineal y cíclica fueron 28.79 min y 29.92 min,

respectivamente. Estos resultados evidencian que el péptido híbrido es más hidrofóbico que tigerinina. Por otro lado, se puede observar que el mayor número de residuos aminoacídicos básicos en la secuencia del híbrido está concentrado en las proximidades del extremo N- terminal, sobre Lys3, Lys7 y Lys8, y que solamente existe un residuo catiónico sobre la región C- terminal, correspondiente a Arg27. Estudios realizados con dermaseptinas-s3 y s4 han demostrado que una adecuada distribución de la carga a lo largo de la secuencia reduce significativamente la actividad hemolítica [37], por lo que se estima que este factor adicional estaría también determinando la alta actividad hemolítica del híbrido. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que híbridos de magainina y protegrina (MG2-PGLa) presentan mayor actividad hemolítica que una mezcla 1:1 de los respectivos péptidos, indicando un aumento de la interacción con membranas eucariotas cuando se combinan las secuencias en un único péptido [38].

#### Estructura secundaria

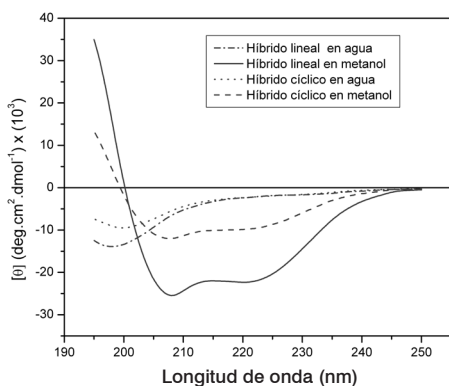
El espectro de DC para TG-1 lineal (HS libres) presenta un mínimo a 194 nm (Figura 1). En el péptido cíclico (S-S intramolecular) se observó un desplazamiento del mínimo hacia longitudes de onda mayores (205



**Figura 1:** Espectro de DC de TG-1 –amida (—) TG-1 lineal, en agua; (...) TG-1 cíclico (puente disulfuro), en agua.

El espectro de TG-1 lineal presenta un mínimo a 194 nm, y en la versión cíclica se observa un desplazamiento del mínimo hacia longitudes de onda mayores (205 nm).

nm). La deconvolución del espectro evidencia una contribución similar de estructuras tipo  $\beta$  (sheet + turn) para las dos versiones de TG-1 (aproximadamente 52 %), con un ligero incremento de turn en el cíclico (28.9 %) en relación al lineal (26.1 %). Para ambas versiones se determinó que un 40 % correspondería a estructuras no ordenadas, indicando la flexibilidad conformacional del loop en medio acuoso.



branas celulares, las dos versiones del péptido híbrido presentaron dos mínimos cercanos a 208 y 223 nm, y un máximo a 190 nm. La deconvolución de estos espectros mostró que existen variaciones en la contribución de los distintos tipos de estructuras secundarias. De este modo, el péptido híbrido lineal presenta en metanol un predominio de  $\alpha$ -hélice (57.5 %), mientras que en su forma cíclica la contribución de estructuras  $\alpha$ -hélice es menor (34.4%); en ambos casos las contribuciones de estructura  $\beta$ -sheet son similares (alrededor del 14 y 15 % respectivamente), pero se observan diferentes contribuciones de estructura tipo turn (9.2 % en el lineal y 32.6 % en el cíclico), con porcentajes de estructura no ordenada próximos al 20 % en ambos casos.

En su conjunto, los análisis por DC evidenciaron la presencia en el híbrido de

En lo relativo al péptido híbrido DS-S1 (1-18)-TG-1, se obtuvieron espectros similares de DC para las versiones lineal y cíclica en medio acuoso, observándose la presencia de un mínimo a 197 nm y 200 nm, respectivamente. Ambos espectros son característicos de polipéptidos no ordenados en solución acuosa (Figura 2).

En metanol, solvente que imita en mejor grado el ambiente hidrofóbico de las mem-

**Figura 2:** Espectro de DC del péptido híbrido DS-S1 (1-18)-TG-1

(—) DS-S1 (1-18)-TG-1 lineal, en 100 % metanol; (- - -) DS-S1 (1-18)-TG-1 cíclico (puente disulfuro), en 100 % metanol; (- · -) DS-S1 (1-18)-TG-1 lineal en agua; (... ) DS-S1 (1-18)-TG-1 cíclico en agua. Los espectros destacan el cambio conformacional que se produce empleando metanol como solvente.

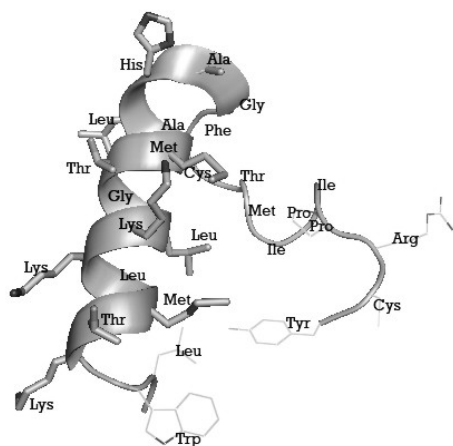
estructura  $\alpha$ -hélice, en coincidencia con lo reportado por otros autores para la región N-terminal de dermaseptina s1(1-18), cuando el péptido se disuelve en solventes orgánicos [21]. Por otro lado, se observa la contribución de estructuras  $\beta$ -sheet y turn, propias de la región correspondiente a TG-1.

Un modelo molecular del híbrido en su versión lineal se obtuvo mediante el software SP<sup>3</sup> [39], y su visualización estructural se realizó con el programa PyMOL, versión 0.97 [40]. La región helicoidal del híbrido se extendería desde Lys4 y hasta Gly18. La región comprendida entre los residuos Thr5 y Ala14 (TMLKKGTLMA) presenta el mayor momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ : 0.490). Se observa la distribución de los residuos polares cargados de Lys4, Lys8 y Lys9, sobre una de las caras de la hélice, y los no polares Met6, Leu7, Leu10, Met13 y Ala14,

sobre la otra. La región 19-29 se presenta sólo parcialmente ordenada en esta representación del péptido lineal, aunque se pueden observar regiones que corresponderían a turns (Figura 3). Comparativamente, dermaseptina s1 (1-34) posee una estructura helicoidal anfipática extendida, en la región 1-27 de la secuencia, y un

dominio C- terminal que carece de estructura regular. Se ha postulado que la región amino terminal podría ser responsable de su actividad lítica, mientras que el extremo carboxilo podría estar implicado en la selección de las células blanco [21].

El reemplazo de la secuencia 19-34 de dermaseptina-s1 por la correspondiente



**Figura 3:** Modelo molecular del híbrido DS-S1 (1-18)-TG-1 en su versión lineal

Se observa el carácter anfipático de la  $\alpha$ -hélice y la distribución de los residuos polares cargados de Lys4, Lys8 y Lys9, sobre una de las caras de la hélice, y de los no polares Met6, Leu7, Leu10, Met13 y Ala14, sobre la otra. La región 19-29 se presenta sólo parcialmente ordenada.

a TG-1 tiene dos efectos marcados en el híbrido: por un lado la pérdida de selectividad, determinada por el notable aumento de la actividad citotóxica sobre eritrocitos humanos, y por el otro lado una interesante diferencia en la actividad antimicrobiana específica, que resulta de comparar la actividad inhibitoria de TG-1 con la del híbrido, resultando ambos activos sobre la cepa de *Bacillus subtilis* ensayada. Es probable que la combinación de las dos secuencias incremente las actividades propias de sus partes, tomando como base los resultados de este trabajo.

### Conclusiones

Hemos demostrado que un péptido híbrido de dermaseptina s-1 y tigerinina-1

presenta un espectro de actividad antimicrobiana amplio, que incluye bacterias y levaduras. Su actividad estaría determinada fundamentalmente por el dominio N-terminal, de naturaleza helicoidal y de carácter anfipático, procedente de dermaseptina s1, el que desempeñaría un rol importante en la interacción inicial del híbrido con las membranas ricas en fosfolípidos aniónicos. La estructura secundaria, en forma global, es similar a la reportada para péptidos aislados del género *Rana* que presentan un loop cíclico sobre el extremo C- terminal. Serán necesarios estudios adicionales para determinar si el loop cíclico presente en el híbrido favorece su inserción en la membrana microbiana a través de un efecto sinérgico, como ha sido propuesto para otros péptidos híbridos.

La elevada actividad hemolítica detectada en el híbrido resultó llamativa, considerando que las partes combinadas carecen de actividad hemolítica. No obstante, el estudio detallado de las propiedades físico-químicas de la secuencia, permitió interpretar estos resultados.

A partir de los resultados obtenidos se abre un gran número de posibilidades para mejorar la selectividad y actividad antimicrobiana de DS-S1(1-18)-TG-1, y para el diseño de nuevos híbridos, mediante la combinación de secuencias con diferente espectro de actividad antimicrobiana.

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del Programa CAI+D-UNL 2006 y 2005 y PICTO 2003 (ANPCyT-UNL).

### Bibliografía

1. Andreu, D.; Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, **47**: 415-433.
2. Clark, D. P.; Durell, S.; Maloy, W. L.; Zasloff, M., 1994. Ranalexin: a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, Polymyxin. *J. Biol. Chem.* **269** (14): 10849-10855.
3. Giangaspero, A.; Sandri, L.; Tossi, A., 2001. Amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5589-5600.
4. Matsuzaki, K., 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense?. Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. et Biophysica Acta* **1462**: 1-10.
5. Dathe, M.; Wieprecht, T., 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potencial to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. et Biophysica Acta* **1462**: 71-87.
6. Krishnakumari, V.; Sharadadevi, A.; Sitaram, N.; Nagaraj, R., 1999. Consequences of introducing a disulfide bond into an antibacterial and hemolytic peptide. *J. Peptide Res.* **54**: 528-535.
7. Papo N.; Shai Y., 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipids membranes?. *Peptides* **24**: 1693-1703.
8. Hancock, R.W., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* **1** (3):156-164.
9. Wang, Z.; Wang, G., 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* **32**: 590-592.
10. Rollins-Smith, L.A.; Conlon, J.M., 2005. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Dev. Comp. Immunol.* **29**(7):589-598.
11. Cirioni, O.; Giacometti, A.; Ghiselli, R.; Mocchegiani, F.; Fineo, A.; Orlando, F.; Del Prete, M. S.; Rocchi, M.; Saba, V.; Scalise, G., 2002. Single-dose intraperitoneal magainins improve survival in a Gram-negative-pathogen septic shock rat model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 101-104.
12. Mor, A.; Hani, K.; Nicolas, P., 1994. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J. Biol. Chem.* **269**: 31635-31641.
13. Goraya, J.; Wang, Y.; Li, Z.; O'Flaherty, M.; Knoop, F.C.; Platz, J.E.; Conlon, J.M., 2000. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 894-900.
14. Mangoni, M.L.; Fiocco, D.; Mignogna, G.; Barra, D.; Simmaco, M., 2003. Functional

- characterisation of the 1-18 fragment of esculentin-1b, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Peptides* **24** (11):1771-1777.
15. Morikawa, N.; Hagiwara, K.; Nakajima, T., 1992. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 184–190.
16. Goraya, J.; Knoop, F.C.; Conlon, J.M., 1998. Ranaturins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**: 589–592.
17. Conlon, J. M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N., 2004. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1696**:1-14.
18. Simmaco, M.; Mignogna, G.; Canofeni, S.; Miele, R.; Magoni, M. L.; Barra, D., 1996. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* **242**: 788–792.
19. Sai, K.P.; Jagannadham, M.V.; Vairamani, M.; Raju, N. P.; Devi, A. S.; Nagaraj, R.; Sitaram, N., 2001. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. *J. Biol. Chem.* **276**: 2701-2707.
20. Sitaram, N.; Sai, K.P.; Singh, S.; Sankaran, K.; Nagaraj, R., 2002. Structure-function relationship studies of the frog skin antimicrobial peptide Tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2279-2283.
21. Mor, A.; Nicolas, P., 1994. The NH<sub>2</sub>-terminal  $\alpha$ -helical domain 1-18 of Dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 1934-1939.
22. Balaban, N.; Gov, Y.; Giacometti, A.; Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Mocchegiani, F.; Orlando, F.; D'Amato, G.; Saba, V.; Scalise, G.; Bernes, S.; Mor, A., 2004. A chimeric peptide composed of a dermaseptin derivative and an RNA III-inhibiting peptide prevents graft-associated infections by antibiotic-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(7):2544-2550.
23. Zerbini, E.; Andreu, D.; Tonarelli, G.; Sequeira M.D., 2006. Sensibilidad in vitro de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana. *Revista Argentina de Microbiología*, **38**(4): 221-223.
24. Bhargava K.; Feix J. B., 2004. Membrane Binding, Structure, and Localization of Cecropin-Mellitin Hybrid Peptides: A Site-Directed Spin-Labeling Study. *Biophys. J.* **86** (1): 329–336.
25. Santi, M.N.; Lorenzón, E.; Costabel, F.; Tonarelli, G., 2008. Ciclación de péptidos sintéticos a través de la formación de lactamas y puentes disulfuro. Aplicación a diferentes modelos de interés biológico. *FABICIB* **12**: 33-45.
26. Tagg, J.R.; MCGiven, A.R., 1971. Assay systems for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **21**: 943-947.
27. Sreerama, N.; Venyaminov, S.Y.; Woody, R.W., 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* **287**: 243–251.
28. Sreerama, N.; Venyaminov, S.Y.; Woody, R.W., 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**: 252–260.
29. Mor, A.; Nguyen, V.H.; Delfour, A.; Migliore-Samour, D.; Nicolas, P., 1991. Isolation, Amino Acid Sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* **30**: 8824-8830.
30. Navon-Venezia, S.; Feder, R.; Gaidukov, L.; Carmeli, Y.; Mor, A., 2002. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo Activity.

- Antimicrob Agents Chemother. **46** (3): 689–694.
- 31.** Kustanovich, I.; Shalev, D.E.; Mikhlín, M.; Gaidukov, L.; Mor, A., 2002. Structural requirements for potent *versus* selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin s4 derivatives. *J.Biol. Chem.* **277** (19): 16941-16951.
- 32.** Kim, H.J.; Kim, S.S.; Lee, M.H.; Lee, B.J.; Ryu, P.D., 2004. Role of C-terminal heptapeptide in pore-forming activity of antimicrobial agent, gaegurin 4. *J. Pept. Res.* **64**(4):151-158
- 33.** Park, S-H.; Kim, H-E.; Kim, C-M; Yun, H-J.; Choi, E-C.; Lee, B.J., 2002. Role of proline, cysteine and disulphide bridge in the structure and activity of the anti-microbial peptide gaegurin 5. *Biochem. J.* **368**: 171-182.
- 34.** Wu, M.; Hancock, R.E.W., 1999. Interaction of the Cyclic Antimicrobial Cationic Peptide Bactenecin with the Outer and Cytoplasmic Membrane. *J. Biol. Chem.* **274** (1): 29-35.
- 35.** Qu, X.D.; Harwig, S.S.; Shafer, W.M.; Lehrer, R.I., 1997. Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **65** (2): 636-639.
- 36.** Tamamura, H.; Ikoma, R.; Niwa, M.; Funakoshi, S.; Murakami, T.; Fujii, N., 1993. Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **41** (5): 978-980.
- 37.** Ghosh, J.K.; Shaool, D.; Guillaud, P.; Cicéron, L.; Mazier, D.; Kustanovich, I.; Shai, Y.; Mor A., 1997. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *J. Biol. Chem.* **272**: 31609-31616.
- 38.** Nishida, M.; Imura, Y.; Yamamoto, M.; Kobayashi, S.; Yano, Y.; Matsuzaki, K., 2007. Interaction of a magainin-PGLa hybrid peptide with membranes: insight into the mechanism of synergism. *Biochemistry* **46** (49):14284-14290.
- 39.** Zhou, H.; Zhou, Y., 2005. Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins* **58**: 321-328.
- 40.** DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, 2002. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>