

## **DISCUSIÓN**

Considerando los resultados obtenidos con PIn149a y su especificidad hacia *Listeria*, descritos en el Capítulo 2, se planteó el diseño de un híbrido formado por los residuos 1-18 de Pediocina PA-1 y los residuos 6-22 de PIn149a.

Pediocina PA-1, al igual que el resto de las bacteriocinas de la clase IIa, presenta actividad antilisteria, pero además es activa hacia otros géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, etc. (González y col., 1987).

Al estudiar el espectro antimicrobiano del péptido híbrido y sus extremos N- y C- terminales mediante la técnica de difusión en agar, se encontró que los péptidos híbridos (PHC y PHL), así como los correspondientes al extremo C-terminal (residuos 6-22 de PIn149a) en sus dos formas: N- $\alpha$ -Fmoc protegido (C-TP) y  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre (C-TD) mostraron, actividad inhibitoria específica hacia cepas del género *Listeria* (Tablas 1-3 y 2-3). El extremo N-terminal del híbrido (residuos 1-18 de Pediocina PA-1) resultó inactivo, coincidentemente con lo reportado por otros autores (Chen y col., 1997). De la misma manera, el pentapéptido correspondiente al extremo N- terminal de PIn149a no presentó actividad antimicrobiana (Tabla 2-3).

La actividad de los diferentes péptidos no varió con la concentración de los mismos a pH 5.5 (Tablas 1-3 y 2-3), ya que el tamaño de los halos fue semejante con concentraciones de 1, 2 y 6 mg/mL. A pH 7.4 el PHL (no así el PHC) mostró un aumento en la actividad antimicrobiana ya que los halos de inhibición aumentaron al pasar de 1 mg/mL a 3.8 mg/mL. Es probable que esta diferencia sea consecuencia de que ambos péptidos (cíclico y lineal) presentan mecanismos de acción diferentes frente a la membrana de la célula sensible.

El aumento de pH favoreció la actividad antimicrobiana de todos los péptidos, ya que los halos de inhibición obtenidos fueron mayores a pH 7.4 respecto de pH 5.5. Según lo reportado en 1997 por Chen y col. en lo referente a la influencia del

pH sobre la actividad antilisteria de Pediocina PA-1, estos autores señalan que al aumentar el pH de 6 a 8 la interacción de la bacteriocina con la membrana bacteriana disminuye, probablemente debido a la desprotonación de las histidinas (pKa cadena lateral: 6.10), las cuales tendrían importancia en la interacción electrostática inicial del péptido con la membrana bacteriana. Para ilustrar al respecto, en la siguiente tabla se presenta un cuadro comparativo de propiedades fisicoquímicas de los péptidos sintetizados, Pediocina PA-1 y Plantaricina A.

**Tabla 1-d3: Cuadro comparativo de propiedades fisicoquímicas de las secuencias sintetizadas, de Pediocina PA-1 y de Plantaricina A.**

Secuencia aminoacídicas	Carga a pH 7	Hidrofilicidad promedio	Aminoácidos		residuos de lisina (K)	(% hemólisis)
			hidrofilicos / N° total de residuos (%)			
(PIn149 a):						
YSLQMGATAIKQVKKLFKKG-amida	+7	0.2	41%		6 (27%)	16
(C-T): GATAIKQVKKLFKKG-amida	+7	0.5	41 %		6 (35 %)	9.6
(PH):						
KYYNGVTCGKHSCSVDWGATAIKQVK KLFKKG-amida	+8	0.1	37%		8 (22 %)	PHL : 2.9 PHC: 0.9
(N-T): KYYNGVTCGKHSCSVDW-amida	+2	-0.2	33%		2 (11 %)	NE
Pentapéptido: YSLQM-amida	+1	-1	40%-		-	NE
(*** Plantaricina A:						
YSLQMGATAIKQVKKLFKKGW	+6	-0.2	36%		5 (22.7 %)	(***)
(*** Pediocina PA-1 (Extremo C terminal):						
GKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	+3.1	-0.3	23 %		2 (7.6 %)	(***)
(*** Pediocina PA-1:						
KYYNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIIN NGAMAWATGGHQGNHKC	+4	-0.3	27 %		4 (9%)	(***)

Los valores de hidrofilicidad promedio y la relación N° de aminoácidos hidrofílicos/N° total de residuos fueron determinados teniendo en cuenta la escala de Hidrofilicidades de Hopp & Woods. (\*\*\*) No fueron sintetizados en este trabajo.

Claramente se observa que el péptido híbrido tiene una carga neta +8 a pH 7 mientras que Pediocina PA-1 posee carga +4. Esta diferencia está asociada con la presencia de un mayor número de residuos de Lys y un menor número de His en el híbrido, en relación a Pediocina PA-1. En relación a esto, resulta también que el

híbrido posee un mayor porcentaje de aminoácidos hidrofílicos en relación a Pediciona PA-1.

En los resultados del capítulo 2 vimos que PIn149a presenta acción marcadamente bactericida. Si comparamos las curvas de evolución poblacional obtenidas con PIn149a, CT-P y CT-D se puede ver que, si bien todos los péptidos tienen efecto bactericida en el término de 24 h, hay diferencias notables en las curvas. En presencia del péptido C-terminal protegido a  $t=0$ , el número de unidades formadoras de colonias desarrolladas fue muy reducido ( $< 2 \cdot 10^4$  UFC/mL), y a partir de las 6 h de cultivo ya no se detectaron células viables por conteo en placas de las muestras obtenidas, situación que se mantuvo hasta las 24 h de incubación (tiempo máximo ensayado) (Figura 8-3). La rápida acción bactericida de este péptido estaría relacionada con la presencia del grupo hidrofóbico Fmoc sobre el extremo N- terminal de la secuencia.

En el caso del péptido C-terminal desprotegido, se observó un comportamiento similar a PIn149 durante las 6 primeras horas de cultivo, ya que el número de células viables disminuyó desde  $8 \cdot 10^6$  a valores de  $5 \cdot 10^2$  UFC/mL. Luego, en el caso de PIn149a, el descenso de las poblaciones microbianas continuó hasta que, a partir de las 12 h de cultivo y hasta las 24 h, ya no se detectaron células viables por cultivo y conteo en placas de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos ensayados. En cambio, en presencia del péptido C-terminal desprotegido el número de células viables se mantuvo constante ( $5 \cdot 10^2$  UFC/mL) entre las 6 y 12 h, para luego descender progresivamente hasta que, a las 24 horas no se detectaron células viables por conteo de placas (Figura 8-3).

Según las curvas de evolución poblacional la acción bactericida de PIn149a es más rápida que la de CT-D. Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la determinación de la CIM, PIn149a es más activa que el péptido C-T desprotegido, ya que CIM obtenidas se pueden ubicar según el siguiente orden decreciente de actividad: PIn149a > PHC > péptido C-terminal desprotegido.

La diferencia de actividad puede explicarse en función de que el péptido CTD no tiene los primeros 5 aminoácidos (YSLQM) que aparecen en la secuencia de

Pln149a, entre los cuales hay dos muy hidrofóbicos como Leu ó L<sub>3</sub> y Met ó M<sub>5</sub>, que facilitarían la interacción con la membrana bacteriana. Estos cinco primeros aminoácidos también son importantes en la variante de 22 aminoácidos de Plantaricina A (PlnA-22), ya que se ha reportado que la misma ejerce su acción de feromona a través de los 5 primeros aminoácidos de su extremo N-terminal (YSLQM) con un receptor de membrana específico a través de una interacción de tipo quiral (Kristiansen y col., 2005).

Pediocina PA-1, al igual que el resto de las bacteriocinas de la Clase IIa, es un péptido con efecto bactericida hacia *Listeria*, que permeabiliza la membrana bacteriana probablemente a través de la formación de poros, causando de esta manera pérdida de fosfato inorgánico y desbalance iónico (Bhunja y col., 1991).

En este trabajo los péptidos híbridos lineal (PHL) y cíclico (PHC) presentaron acción bactericida de igual magnitud en el término de 24 h. Se determinó que cuando se agregaba la solución de PHC a un cultivo en fase logarítmica de dicha cepa, el número de células viables por mL disminuía desde  $2 \cdot 10^6$  a valores de  $6 \cdot 10^3$  UFC/mL, luego de 6 h de incubación. El descenso de las poblaciones microbianas continuó en forma progresiva hasta las 24 horas (tiempo máximo ensayado), tiempo al cual ya no se detectaron células viables por cultivo y conteo en placas de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos ensayados.

En el caso del PHL el número de células viables por mL disminuyó desde  $8 \cdot 10^5$  hasta  $8 \cdot 10^2$  UFC/mL, luego de 6 h de incubación, durante las 6 horas siguientes las UFC/mL se mantuvieron constantes para luego continuar disminuyendo en forma progresiva hasta no detectarse células viables por cultivo y conteo en placas. En el cultivo control, el número de células viables de las mismas cepas indicadoras por mL se incrementó progresivamente desde  $1 \cdot 10^7$  hasta aproximadamente  $4.6 \cdot 10^8$  UFC/mL, luego de un período de incubación de 24 horas (Figura 9-3).

Numerosos estudios realizados sobre las bacteriocinas de Clase IIa, sugieren que diferentes partes de las secuencias desempeñan un rol distinto en el mecanismo de acción: la secuencia consenso N-terminal, YGNGV, que forma una

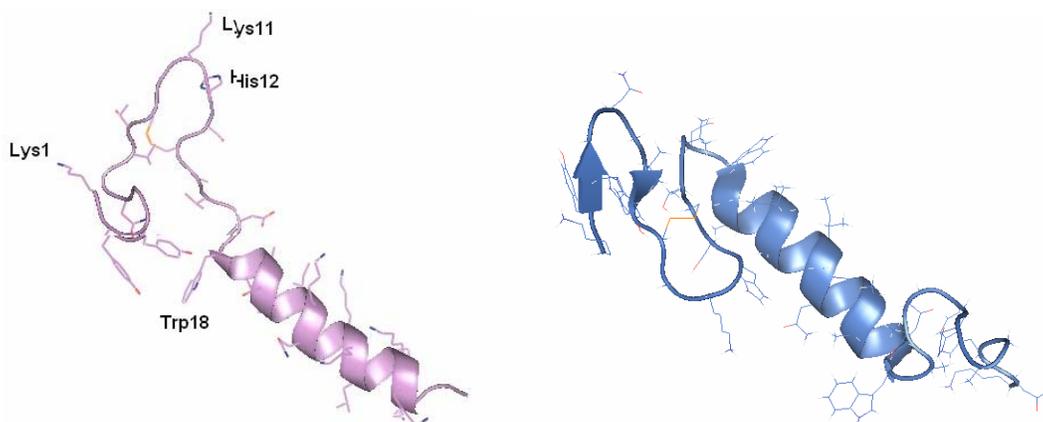
estructura tipo  $\beta$ -turn; la parte hidrofílica N-terminal, que forma una estructura lámina beta anfifílica y que contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente (K<sub>1</sub>, K<sub>11</sub> y H<sub>12</sub>) y una serie de aminoácidos hidrofóbicos (V<sub>7</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>14</sub>, V<sub>16</sub> y W<sub>18</sub>), responsables del proceso de interacción inicial con la membrana bacteriana; el dominio central formado por la  $\alpha$ -hélice hidrofílica y ligeramente anfifílica; el extremo C-terminal hidrofóbico bajo la forma de  $\alpha$ -hélice anfifílica y los puentes disulfuro (Ver Introducción, Pág. 9, Figura 1b).

Utilizando el programa AntheProt 4.0 se analizaron las dos regiones bien definidas del péptido híbrido diseñado, y el resultado de tales predicciones sugirió un predominio de estructura beta para la secuencia N-T (lámina beta y turn) y de estructura helicoidal para C-T. Con la unión de ambas partes del PH, la predicción estableció un 54 % de estructura Turn, seguida de un 37% de estructura  $\alpha$ -hélice, y un 9% de lámina- $\beta$ .

Los resultados indicaron que el péptido híbrido diseñado contenía los motivos estructurales básicos que caracterizan a las bacteriocinas de la Clase IIa.

En las dos figuras siguientes se pueden comparar los modelos moleculares del péptido híbrido diseñado y Sakacina P (bacteriocina de Clase IIa) (Figura 1-d3).

**Figura 1-d3: Modelos moleculares del PH (en rosa) y Sakacina P (en azul).**



El modelo molecular del PH fue obtenido mediante el software SP<sup>3</sup> 1.0 (Zhou y col., 2005), la estructura de Sakacina P fue obtenida del Protein Data Bank (Código: 10G7, Uteng y col., 2003). La visualización de las estructuras se realizó mediante el programa Pymol V 0.95 (Delano, 2002).

Se ha propuesto que la región lámina beta hidrofílica y anfifílica N-terminal (residuos aminoacídicos 1 a 18) es solamente necesaria para el anclaje inicial del péptido a la membrana biológica, además de inducir la estabilización conformacional del extremo C-terminal. (Chen y col., 1997b).

Los resultados obtenidos con el péptido NT concuerdan con lo anteriormente expuesto, ya que tampoco hemos encontrado que este péptido (cuya secuencia corresponde al extremo N-terminal de Pediocina PA-1) posea actividad antimicrobiana.

Las bacteriocinas de Clase IIa ejercen su acción bactericida a través de la formación de poros sólo cuando presentan su secuencia completa, gracias a la inserción en la membrana de las células blanco del dominio C-terminal, bajo la forma de  $\alpha$ -hélice. Mientras que la región N-terminal de las bacteriocinas de la Clase IIa más representativas es altamente conservada, la región C-terminal es mucho más variable y heterogénea y de escasa actividad antimicrobiana (Ennahar y col., 2000). Estudios realizados mediante el diseño de híbridos constituidos por regiones N- y C- terminales de diferentes bacteriocinas de Clase IIa, han demostrado que la especificidad en la acción antimicrobiana de dichos péptidos depende de la bacteriocina de la cual deriva el extremo C-terminal (Fimland y col., 1996). Es decir, el extremo C-terminal sería el responsable de la especificidad de acción de las bacteriocinas Clase IIa.

En nuestro caso el extremo C-terminal del péptido híbrido presenta por sí mismo actividad antimicrobiana significativa y de potencia similar a su péptido de origen: Pln149a. El híbrido diseñado es novedoso en cuanto está formado por porciones de secuencias pertenecientes a bacteriocinas de clases diferentes. Los resultados obtenidos a pH 5.5 en relación al espectro antimicrobiano del péptido híbrido diseñado son coincidentes con las conclusiones de Fimland y col, ya que al unir el extremo N-terminal de Pediocina PA-1 al fragmento de Pln149a (bacteriocina no perteneciente a la Clase IIa), el híbrido resultante mantuvo parte del espectro de acción de Pln149a.

Recientemente, a través de modelos predictivos de la estructura tridimensional de Pediocina PA-1, se ha reportado que el puente disulfuro del extremo N-terminal facilitaría que los residuos positivamente cargados de Lisina e Histidina se acercaran para formar un núcleo de aminoácidos cargados positivamente, que permitiría una fuerte interacción inicial del péptido con los lípidos negativamente cargados de la membrana bacteriana (Chen y col., 1997b) (ver introducción, página 22, Figura 4).

Debido a que se ha detectado actividad antimicrobiana tanto con el PHL como con el PHC, y que las curvas de evolución poblacional demostraron un efecto bactericida similar en ambos péptidos, los resultados obtenidos sugieren que el puente disulfuro en la región N-terminal no es indispensable para la actividad antilisteria. Este resultado es concordante con los obtenidos para Leucocina A (Hastings y col., 1991), Sakacina A (Holck y col., 1992), Sakacina P (Eijsink y col., 1998), Curvacina A (Eijsink y col., 1998) y Carnobacteriocina B2 (Quadri y col., 1994). En estas bacteriocinas de Clase IIa que contienen un solo puente disulfuro sobre la región N-terminal, se ha visto que la reducción de los mismos provoca una disminución muy leve en la actividad antilisteria, y por lo tanto el puente disulfuro no sería crucial para la actividad antimicrobiana.

A fin de correlacionar la actividad antimicrobiana de los péptidos con la estructura conformacional se investigó la estructura secundaria mediante Dicroísmo circular y fluorescencia.

En una primera instancia se obtuvieron los espectros de DC utilizando agua como solvente. Los espectros de PHL y PHC presentaron la forma característica de los correspondientes a péptidos no estructurados en solución acuosa, con un mínimo a 198 nm (Figura 10-3 a y b). Los porcentajes de estructura secundaria calculados por el programa CONTILL (incluido en el paquete de programas CDPPro) evidenciaron bajos porcentajes de estructura tipo turn, lámina  $\beta$  y  $\alpha$ -hélice en el PHL, con un 87.8 % de estructura no ordenada. Para el PHC se determinó un 16.9% de estructura tipo lámina- $\beta$  y un 69.8 % de estructura no ordenada, indicando estos resultados que la ciclización del péptido estabilizó la conformación

del híbrido, incrementándose además el contenido en estructura lámina beta. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos mediante Espectroscopía de fluorescencia para el péptido híbrido (versiones PHL y PHC) estudiado en buffer fosfato de sodio pH 7.4. En primer lugar el  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión observado para ambos péptidos fue 351 nm (Figura 14-3), el cual coincide con el  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión registrado en la bibliografía para el triptofano libre en medio acuoso o para el triptofano ubicado en la superficie de las proteínas (en contacto con las moléculas de agua) (Ladokhin, 2000). Esto indica que tanto PHL como PHC están poco estructurados en medio acuoso.

En segundo lugar, mediante las experiencias de apagamiento en buffer fosfato de ambos péptidos se estableció que la  $K_{\text{sv}}$  para el PHC es menor ( $0.0097 \text{ M}^{-1}$ ) en comparación con la  $K_{\text{sv}}$  del PHL ( $0.0198 \text{ M}^{-1}$ ) (Figura 16-3). Estos valores reflejan que en medio acuoso, el triptofano del PHC se encuentra en un medio ambiente local más hidrofóbico que en el PHL, debido al cambio conformacional asociado a la ciclización. Este hecho podría estar facilitando el acercamiento de grupos no polares de aminoácidos vecinos hacia el  $W_{18}$  haciéndolo menos accesible al apagador.

Cuando se estudió la conformación del PH mediante DC a diferentes porcentajes de TFE se observó un cambio conformacional de similar magnitud en ambos péptidos (PHL y PHC), con un notable incremento del porcentaje de hélice (Figura 10-3 a y b y Tabla 5-3).

Al estudiar el comportamiento de los PHL y PHC mediante Espectroscopía de fluorescencia en presencia de micelas inversas de AOT ( $W_o=16$ ), se observó un desplazamiento del  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión hacia menores longitudes de onda para ambos péptidos, del orden de 19 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión: 332 nm) (Figura 15-3). La forma del espectro se corresponde con la emisión del triptofano reportada por la bibliografía cuando éste se encuentra dentro de las proteínas en un ambiente apolar formado por moléculas de agua con poco grado de libertad (Ladokhin, 2000).

En el sistema de micelas inversas de AOT el agua interacciona con las cabezas polares del AOT mediante la formación de puentes hidrógeno, y se distribuye formando distintas capas moleculares con diferentes grados de movilidad, siendo ésta mayor hacia el centro de la micela (Ladanyi y col., 1999). El resultado obtenido sobre el desplazamiento del  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión indica que el residuo W<sub>18</sub> del PH tanto en su forma lineal como cíclica se ubica dentro de la micela, del lado no polar de la interfase hidrofóbica (cadenas no polares del AOT). Se puede deducir a través de la escasa diferencia entre el valor de la constante de Stern-Volmer calculada para el PHC ( $K_{\text{sv}}$ : 0.0039M<sup>-1</sup>) y para el PHL ( $K_{\text{sv}}$ : 0.0088 M<sup>-1</sup>), que el grado de penetración en la interfase no polar de la micela es semejante en ambos péptidos, aunque ligeramente mayor para el PHC debido a la presencia del puente disulfuro.

En base a estos resultados se podría considerar como potencialmente probable que el mecanismo de acción del híbrido fuera semejante al propuesto para las bacteriocinas de la Clase IIa (Ver Introducción, Pág. 15, Figura 2a y 2b).

No obstante, se requerirán nuevos estudios espectroscópicos, incluyendo Resonancia magnética nuclear (RMN) y Resonancia paramagnética electrónica (EPR) en diferentes sistemas biomiméticos (micelas y liposomas) para corroborar esta hipótesis, que surge como resultado de las experiencias realizadas.

El espectro de DC del péptido C-terminal protegido y desprotegido demostró que en solución acuosa ambos poseen una estructura no ordenada (Figura 11-3 a y 12). En TFE y/o metanol se observó para ambos péptidos un cambio conformacional hacia una estructura predominantemente helicoidal (Tabla 6-3). Estos resultados sugieren que la interacción del péptido C-terminal, tanto protegido como desprotegido, con la membrana bacteriana trae aparejado el cambio conformacional, similarmente a lo detectado para PIn149a (Figuras 11-3b y 12).

El espectro de DC del péptido N-terminal lineal y cíclico evidenció que en solución acuosa ambos poseen una estructura no ordenada (Figuras 13-3 a y b).

Sin embargo, la presencia del puente disulfuro hace que el péptido cíclico esté más ordenado (Tabla 7-3 y 8-3). En presencia de TFE ninguno de los péptidos se estructura considerablemente.

Para péptidos de interés farmacológico, una combinación de elevada actividad antimicrobiana con una baja actividad hemolítica es esencial. La membrana de los glóbulos rojos de células eucariotas está compuesta fundamentalmente por fosfolípidos neutros y tiene un alto contenido en colesterol (Gennis, 1989). Una gran cantidad de estudios describen la influencia de ciertas características de los péptidos antimicrobianos sobre la actividad hemolítica de los mismos, a saber: carga, helicidad, hidrofobicidad intrínseca, momento hidrofóbico y la relación de tamaño de los dominios polar/hidrofóbico. Así es como se ha encontrado que la presencia de una hélice anfipática (periodicidad de 3 o 4 residuos polares con otros tantos no polares) es esencial para la acción sobre membranas formadas por lípidos neutros como la de los glóbulos rojos (Dathe y col., 1999).

En el presente trabajo no se detectó actividad hemolítica significativa para ninguno de los péptidos ensayados, lo cual indica una gran selectividad por parte de los mismos hacia la membrana bacteriana. Sin embargo podemos ubicarlos según un orden decreciente de actividad hemolítica: PIn149a>CTD>CTP>PHC (Tabla 4-3). Este orden se puede explicar considerando las diferencias en estructura de los péptidos y en hidrofobicidad. En el caso particular de PIn149a y C-T, ambos péptidos adoptan una estructura helicoidal en ambientes hidrofóbicos, pero PIn149a posee cinco residuos aminoácidos sobre su extremo N- terminal que determinan que sea un péptido más hidrofóbico que C-T. Esto es coherente con lo reportado por Ohmori y col., quienes han establecido que existe una relación directa entre la actividad hemolítica y la hidrofobicidad (Ohmori y col., 1998).

## **CONCLUSIONES**

La bacteriocina híbrida diseñada en este trabajo presentó elevada especificidad en su acción antimicrobiana hacia cepas del género *Listeria*, con un notorio efecto bactericida.

En relación a Pediocina PA-1, una de las bacteriocinas antilisteria más promisorias para la industria de los alimentos, el híbrido presenta algunas características estructurales que resultan particularmente interesantes y ventajosas: no posee metionina, aminoácido que se oxida a sulfóxido de metionina durante el almacenamiento, con la consecuente pérdida de actividad; posee un solo puente disulfuro, que como hemos demostrado en este trabajo, no es imprescindible para su actividad y a diferencia de Pediocina PA-1, es más activo a pH 7.4 que a pH 5.5, como consecuencia de las diferencias en la composición de aminoácidos.

El puente disulfuro del extremo N-terminal del PH no es indispensable para la actividad antilisteria.

La región N- terminal de Pediocina PA-1 (residuos 1-18), también presente en el híbrido, facilita la interacción inicial de la bacteriocina con la membrana bacteriana, pero como tal no tiene actividad antilisteria.

Todos los péptidos diseñados en este trabajo han mostrado ser selectivos en su acción hacia las membranas bacterianas, dado que ninguno de ellos mostró una capacidad significativa para producir la lisis de glóbulos rojos

Los estudios de apagamiento de la Fluorescencia sobre el residuo de  $W_{18}$  en el PH en presencia de micelas inversas de AOT permitieron anticipar que el mecanismo de inserción de dicho péptido en la membrana bacteriana podría ser similar al propuesto para las bacteriocinas de Clase IIa. Sin embargo, es posible

que exista cierta diferencia en el mecanismo entre el PHL y el PHC, en función de la variación observada en la actividad antimicrobiana para el PHL con la concentración.

En función del rápido efecto bactericida detectado para el péptido C-Terminal protegido, el cual presenta en su estructura el grupo Fmoc, no natural e hidrofóbico, se han comenzado a realizar trabajos sobre diseño de nuevos análogos de la región 6-22 de PIn149a, incorporando diferentes grupos hidrofóbicos sobre su extremo N- terminal.

Mediante acilación con ácido n-octanoico recientemente hemos sintetizado un análogo que presenta baja actividad hemolítica y un espectro de actividad antimicrobiano más amplio, que incluye bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*).