

Mecanismos de acción de péptidos antibacterianos Ib-M contra *Escherichia coli*. Un estudio estructural y proteómico. Avances de resultados

Ana Elvira Farfán-García^{1,2} Eliana Durley Restrepo-Pineda³,
Johanna Marcela Flórez-Castillo^{2,4}

RESUMEN

Introducción: los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una buena opción terapéutica contra bacterias multirresistentes. Sin embargo, el uso terapéutico de los AMPs se ha obstaculizado, debido a su inestabilidad en ambientes específicos, propensión al clivaje por proteasas o en algunos casos citotoxicidad. Estos exhiben pequeño tamaño, carga neta positiva y anfipaticidad, necesarios para adquirir estructura secundaria, en superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, lo que facilita su interacción electrostática con las membranas bacterianas. Los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6, evaluados en este estudio, son análogos sintéticos del péptido Ib-AMP4, nativo de la planta *Impatiens balsamina*, que fueron obtenidos después de modificar su carga neta e hidrofobicidad mediante la inserción de arginina y triptófano. Resultados previos mostraron actividad inhibitoria de los péptidos Ib-M menor a 10 μ M contra *Escherichia coli* O157:H7 y en aislados clínicos, sin evidencia de citotoxicidad en células Vero, por lo que se consideran agentes antibacterianos promisorios.

Planteamiento del problema: estudios recientes, señalan que la evaluación de las interacciones de los AMPs con las membranas bacterianas, de los cambios en el proteoma o en su transcriptoma, además de los análisis de estructura secundaria de péptidos

por difracción circular (DC) en membranas y buffers, es posible aproximarse al conocimiento del mecanismo de acción que los AMPs ejercen en las bacterias. Si bien, ya se ha determinado la actividad antibacteriana de los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6 contra *E. coli*, aún no se conocen los factores que pueden estar relacionados con su actividad biológica y el tiempo que requieren para eliminar las células viables. Por lo tanto, este trabajo pretende evaluar cuál es el mecanismo de acción bactericida que ejercen los péptidos Ib-M contra *E. coli*, mediante el abordaje y la combinación de estudios estructurales, de estabilidad y proteómicos, con el fin de brindar información para la realización de estrategias de inmovilización de péptidos, que faciliten su direccionamiento y dosificación hacia blancos moleculares.

Objetivo general: evaluar los mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos Ib-M contra *E. coli* mediante estudios estructurales y proteómicos.

Metodología: este es un estudio experimental *in vitro*. La estructura secundaria de los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6 en buffers se analizará por DC. Se establecerá la actividad biológica de los péptidos contra *E. coli* ATCC® 25922™ mediante la concentración mínima inhibitoria y bactericida (MIC y MBC) y actividad citotóxica en una línea celular. Posteriormente, se realizarán los estudios de estabilidad de péptidos, permeabilidad de membranas, afinidades de unión al lipopolisacárido (LPS) y cambios en los potenciales de membrana, cuyos resultados se correlacionarán con los de microscopía electrónica. Además, se evaluará si existe interacción de los Ib-M con el material genómico y con el proteoma de *E. coli*. Cada ensayo se realizará por triplicado, con controles y en mínimo tres experimentos independientes.

Resultados preliminares obtenidos: los resultados de DC mostraron que los péptidos Ib-M en el dodecilsulfato de sodio (SDS) adquirieron una conformación de hélices- α . Se observó una fuerte banda positiva a 190 nm y dos mínimos definidos, en 206 y 226 nm para los tres péptidos. En Tris-HCl y agua, los péptidos Ib-M2 e Ib-M6 no obtuvieron una estructura secundaria, sin embargo, Ib-M1 exhibió la estructura de Poliprolina II. Las predicciones del modelamiento de la estructura secundaria de los péptidos Ib-M,

¹ Doctorado Ciencias Básicas Biomédicas. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

² Grupo de Investigación en Manejo Clínico –CliniUDES– Universidad de Santander, Bucaramanga, Santander.

³ Doctorado Ciencias Básicas Biomédicas. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Grupo Bacterias y Cáncer. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

⁴ Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas –CIBAS– Universidad de Santander. Bucaramanga, Santander.

Correspondencia: Ana Elvira Farfán, ana.farfan@udea.edu.co

Financiación: MinCiencias. Códigos: 1299980763392 CT-760-2018, 129974455449 CT-778-2016.

evidenciaron dos hélices- α unidas por una estructura random o aleatoria. Se determinó la MIC (12,5 μ M) de los péptidos Ib-M contra *E. coli*, cuyo efecto bactericida en la MBC no superó en más de dos veces su valor. A diferentes concentraciones de péptidos, incluida la MIC, se observó permeabilidad de la membrana externa e interna de *E. coli* con la sonda fluorescente N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN) y en la prueba de O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), siendo en ambos casos superior al control. Así mismo, alteraciones en la membrana fueron reveladas en la microscopía electrónica de barrido (SEM), en la que la mayoría de las células tratadas con los péptidos Ib-M durante una hora, mostraron significativas disrupciones de la membrana. Estas se caracterizaron por encogimiento, rugosidades, invaginaciones profundas, formación de poros, protuberancias variables en tamaño y pérdida de la estructura bacilar, a diferencia del control, que conservó su tamaño y forma.

Discusión y conclusiones preliminares: de forma preliminar, los resultados de los análisis de DC de los Ib-M en solventes que mimetizan la membrana hidrofóbica de *E. coli* como el SDS, sugiere probablemente que los péptidos Ib-M adquieren una estructura secundaria tridimensional estable en la presencia de la membrana celular hidrofóbica. El significativo deterioro de la membrana de *E. coli* observado en SEM y correlacionado con los cambios en la permeabilidad de la membrana orientan, el tipo actividad ejercida por los péptidos.

PALABRAS CLAVE

Péptidos, Antibacterianos, *Escherichia coli*, Relación Estructura-Actividad, Membrana Celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias M, Jensen KV, Nguyen LT, Storey DG, Vogel HJ. Hydroxy-tryptophan containing derivatives of tritrypticin: modification of antimicrobial activity and membrane interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(1 Pt B):277-88.
- Arias M, Hoffarth ER, Ishida H, Aramini JM, Vogel HJ. Recombinant expression, antimicrobial activity and mechanism of action of tritrypticin analogs containing fluoro-tryptophan residues. *Biochim Biophys Acta*. 2016 May;1858(5):1012-23.
- Ashby M, Petkova A, Hilpert K. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(3):258-67.
- Barreto-Santamaría A, Rivera ZJ, García JE, Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA, Arévalo-Pinzón G. Shorter Antibacterial Peptide Having High Selectivity for *E. coli* Membranes and Low Potential for Inducing Resistance. *Microorganisms*. 2020; 8(6):867
- Barreto-Santamaría A, Curtidor H, Arévalo-Pinzón G, et al. A New Synthetic Peptide Having Two Target of Antibacterial Action in *E. coli* ML35. *Front Microbiol*. 2016; 7:2006.
- Fan X, Korytowski A, Makky A, Tanaka M, Wink M. Ib-AMP4 insertion causes surface rearrangement in the phospholipid bilayer of biomembranes: Implications from quartz-crystal microbalance with dissipation. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1860(2):617-623.
- Flórez-Castillo JM, Perullini M, Jobbágy M, Cano-Calle HJ. Enhancing Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* K-12 of Peptide Ib-AMP4 with Synthetic Analogues. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2014;20(3):365-369.
- Flórez-Castillo JM, Rondón-Villareal P, Ropero-Vega JL, Mendoza-Espinel SY, Moreno-Amézquita JA, Méndez-Jaimes KD, Farfán-García AE, Gómez-Rangel SY, Gómez-Duarte OG. Ib-M6 Antimicrobial Peptide: Antibacterial Activity against Clinical Isolates of *Escherichia coli* and Molecular Docking. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2):79.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. 2007;2(1):1-33.
- Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(3):156-64.
- Hancock REW, Alford MA, Haney EF. Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(12):786-797.
- Kozłowska J, Vermeer LS, Rogers GB, Rehnuma N, Amos SB, Koller G, McArthur M, Bruce KD, Mason AJ. Combined systems approaches reveal highly plastic responses to antimicrobial peptide challenge in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004104.
- Liu B, Huang H, Yang Z, Liu B, Gou S, Zhong C, Han X, Zhang Y, Ni J, Wang R. Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial

- activity *in vitro* and *in vivo* by intermolecular triazole bridge strategy. *Peptides*. 2017;88:115-125.
14. Mandel S, Michaeli J, Nur N, et al. OMN6 a novel bioengineered peptide for the treatment of multidrug resistant Gram negative bacteria. *Sci Rep*. 2021;11(1):6605.
 15. Miao J, Chen F, Duan S, Gao X, Liu G, Chen Y, Dixon W, Xiao H, Cao Y. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of the Antimicrobial Mechanism of Peptide F1 against *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015; 63(32):7190-7197.
 16. Prada-Prada S, Flórez-Castillo J, Farfán-García A, Guzmán F, Hernández-Peñaranda I. Antimicrobial activity of Ib-M peptides against *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*. 2020;15(2): e0229019.
 17. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(5):407-31.
 18. Sinha S, Zheng L, Mu Y, Ng WJ, Bhattacharjya S. Structure and Interactions of A Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. *Sci Rep*. 2017;7(1):17795.
 19. Tailor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BP, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem*. 1997;272(39):244807.