



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Determinantes estructurales de la selectividad a fosfolípidos y de la actividad antibacteriana de la defensina de *Capsicum chinense* J1-1

Tesis que presenta

Gilberto Andrés Muñoz Pérez

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Marzo, 2024

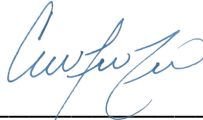
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Gilberto Andrés Muñoz Pérez titulado **Determinantes estructurales de la selectividad a fosfolípidos y de la actividad antibacteriana de la defensina de *Capsicum chinense* J1-1**, fue realizado en la Unidad de Biología integrativa, en la línea de investigación Interacción planta-ambiente, en el laboratorio 10 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Georgina Estrada Tapia, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de abril de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

M. en C. Gilberto Andrés Muñoz Pérez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado Estudio de las defensinas recombinantes de plantas y sus aplicaciones como antimicrobianos bajo la dirección de la Dra. Georgina Estrada Tapia.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías**, por la beca número 775005.

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** y a la **Unidad de Biología Integrativa**, por las instalaciones para la realización del trabajo que me permitió obtener este grado.

A mi asesora, la **Dra. Georgina Estrada Tapia**, por la dirección, el apoyo y todas las facilidades dadas para el desarrollo de este trabajo.

Al comité tutorial y revisores de tesis: **Dra. Virginia Herrera, Dra. Elia Diego, Dr. Manuel Martínez, Dr. Ignacio Islas, Dra. Itzel Amaro** y a la **Dra. Nayeli Rodríguez**. A todos, gracias por sus recomendaciones y sugerencias.

Al **Dr. Iván Arenas**, la **Dra. Herlinda Clement** y al **Dr. Gerardo Corzo** por su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la **M. en C. Lucila Sánchez** por su apoyo constante en el laboratorio, el cual fue importante para el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Francisco Guillén** por su apoyo en la obtención de los datos experimentales, y por permitirnos el acceso a la Unidad Académica de la UNAM, Campus Sisal para la realización de parte del trabajo experimental con bacterias.

DEDICATORIAS

A Dios.

A mis padres **Juanita Pérez** y **Andrés Muñoz**, gracias por todo su esfuerzo y amor.

LISTA DE PRODUCTOS GENERADOS

Artículo científico:

- Gilberto A. Muñoz-Pérez, Francisco A. Guillén-Chablé, Lucila A. Sánchez Cach, Iván Arenas-Sosa, Gerardo Corzo and Georgina Estrada. (2024). **Antibacterial activity improvement in a point mutant K45E of the pepper defensin J1-1.** (Sometido).

Texto de divulgación:

- Gilberto Muñoz-Pérez, Lucila Sánchez-Cach y Georgina Estrada-Tapia. (2020). **Péptidos de defensa: una alternativa natural para el control de patógenos de plantas y humanos.** Desde el Herbario CICY, 12: 88-93.

Actividades de divulgación:

- Participación en CICY casa abierta 2023: “Los hongos del jardín”.

Congresos:

- Gilberto Andrés Muñoz-Pérez, Francisco Guillén-Chablé, Lucila Sánchez-Cach y Georgina Estrada. **Structural analysis of *Capsicum* defensin J1-1 and expression of J1-1 K45E variant in *Escherichia coli*.** XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. 16-21 de octubre de 2022. Mérida, Yucatán, México.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTADO DE FIGURAS	IV
LISTADO DE TABLAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
ANTECEDENTES	4
1.1. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS.....	4
1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS VEGETALES.....	5
1.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS.....	7
1.3.1. Mecanismo general de acción de los AMPs.....	8
1.4. DEFENSINAS DE PLANTAS.....	9
1.4.1. Origen del estudio de las defensinas de plantas	11
1.4.2. Modos de acción generales de defensinas de plantas	12
1.4.2.1. Mecanismos de acción antifúngicos e internalización	13
1.4.2.2. Mecanismos de acción antibacterianos de defensinas de plantas	14
1.5. DEFENSINA J1-1	16
1.6. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSINAS DE PLANTAS.....	17
1.7. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DEFENSINAS DE PLANTAS.....	18
1.8. PATÓGENOS ESKAPE: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Importancia Epidemiológica)	20
1.9. ACTIVIDADES DESCRITAS EN DEFENSINAS DE PLANTAS	21
1.10. RESPUESTA AL EFECTO ANTIMICROBIANO GENERADO POR DEFENSINAS DE PLANTAS EN PATÓGENOS.....	22
1.11. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PRINCIPALES LIGANDOS LIPÍDICOS Y SU RELACIÓN CON LAS DEFENSINAS.....	24
1.12. DETERMINANTES ESTRUCTURALES PARA EL RECONOCIMIENTO DE LÍPIDOS 26	
1.12.1. El γ -core.....	27
1.12.2. Actividad antimicrobiana del γ -core	27
1.12.3. Determinantes estructurales en defensinas de plantas	30
1.13. DEFENSINAS DE PLANTAS COMO ANTICANCERÍGENOS Y ANTIBACTERIANOS.....	32
JUSTIFICACIÓN	35

HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
CAPÍTULO II	39
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1.1. Vectores de expresión.....	39
2.1.2. Diseño de mutantes	39
2.1.3. Alineamiento de secuencias peptídicas.....	40
2.1.4 Análisis <i>in silico</i> del péptido J1-1 y mutantes.....	41
2.1.5. Determinación <i>in silico</i> del potencial de superficie.....	41
2.1.6. Síntesis de gBlocks de mutantes de J1-1.....	41
2.1.7. Clonación de los gBlocks mutantes en pGEM-TEasy.....	41
2.1.8. Digestión de los plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4 ..	42
2.1.9. Construcción de los plásmidos de expresión pQE30_J1-1_KTE y pQE30_J1-1_DEF4	43
2.1.10. Expresión recombinante de J1-1 y mutantes.....	44
2.1.11. Purificación de péptidos recombinantes	44
2.1.12. Perfiles de los péptidos purificados en SDS-PAGE	45
2.1.13. Western blot con el anticuerpo policlonal anti-J1	46
2.1.14. Cuantificación de proteínas	46
2.1.15. Análisis de la interacción péptido-lípido <i>in vitro</i>	47
CAPÍTULO III	48
3.1. RESULTADOS	48
3.1.1. Características físico-químicas de J1-1 y mutantes.....	48
3.1.2. Potencial de superficie de J1-1 y mutantes	48
3.1.3. Obtención de plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4	49
3.1.4. Obtención de los plásmidos de expresión pQE30_J1-1_KTE y pQE30_J1-1_DEF4	51
3.1.5. Péptidos recombinantes purificados por Ni-NTA y HPLC _{FR} e inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-J1-1.....	53
3.1.6. Análisis de interacción lípido-péptido <i>in vitro</i>	57
CAPÍTULO IV	59
4. DISCUSIÓN GENERAL	59
CAPÍTULO V	65
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	65

5.1 Conclusiones.....	65
5.2 Perspectivas.....	65
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXO	83
Antibacterial Activity Improvement in a Point Mutant K45E of the Pepper Defensin J1-1.83	
Introduction	84
Materials and Methods	86
Results	90
Discussion.....	99
Conclusions.....	101

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Modelo Zig-Zag	5
Figura 1.2. Estructuras tridimensionales de péptidos antimicrobianos de plantas	8
Figura 1.3. Mecanismos de permeabilización de membranas de AMPs.....	9
Figura 1.4. Interacción MtDef4 vs membrana plasmática	10
Figura 1.5. Evolución en el tiempo de la investigación en el área de defensinas de plantas.....	12
Figura 1.6. Clasificación de defensinas de acuerdo a sus características estructurales	19
Figura 1.7. Múltiples actividades de las defensinas de plantas.....	22
Figura 1.8. Estructuras de fosfolípidos	26
Figura 1.9. Estructura tridimensional del complejo NaD1-PI (4,5) P2 y perfil de unión a lípidos de NaD1 y mutantes in vitro.....	31
Figura 2.1. Determinantes estructurales del dímero NaD1 en la interacción con PIP2	40
Figura 3.1. Estructura primaria y características físico-químicas de los péptidos recombinantes	48
Figura 3.2. Potencial electrostático de superficie en J1-1 y mutantes.....	49
Figura 3.3. Amplificación de secuencias mutantes de J1-1 a partir de plásmidos pGEM-TEasy	50
Figura 3.4. Resultados de secuenciación de los plásmidos pGEM-TEasy.....	51
Figura 3.5. Purificación de vector pQE30 e insertos J1-1_KTE o J1-1_DEF4 previamente digeridos con enzimas de restricción	51
Figura 3.6. Amplificación a partir de vector pQE30 del inserto J1-1_KTE o J1-1_DEF4.....	52
Figura 3.7. Secuencia del plásmido pQE30 conteniendo la secuencia codificante de la mutante J1-1_KTE.....	53
Figura 3.8. Secuencia del plásmido pQE30 conteniendo la secuencia codificante de la mutante J1-1_DEF4.....	53
Figura 3.9. Perfiles de purificación por Ni-NTA de los péptidos recombinantes	54
Figura 3.10. Purificación por Ni-NTA de J1-1_KTE y J1-1_DEF4.....	55
Figura 3.11. Inmunodetección de los péptidos recombinantes con el anticuerpo anti-J1-1.....	56
Figura 3.12. Perfil de unión a lípidos de los péptidos recombinantes	57
Figure 1. Structure model and properties of recombinant J1-1_K45E.....	91
Figure 2. Affinity Chromatography Purification of the recombinant J1-1_K45E.....	92
Figure 3. rpHPLC chromatogram of recombinant J1-1_K45E.....	93
Figure 4. Detection of J1-1 and J1-1K45E by SDS-PAGE and WB.	94
Figure 5. J1-1 and J1-1_K45E molecular surface electrostatic potential of dimers.	95

Figure 6. J1-1 and J1-1_K45E cross-linking and immunodetection.	97
Figure 7. Antibacterial activity of J1-1_K45E against.	98
Figure 8. J1-1_K45E lipid binding.....	98

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Péptidos antimicrobianos aprobados por la FDA.....	33
Tabla 1.2. Defensinas en desarrollo para aplicaciones clínicas	34

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPs	Antimicrobial peptides
Arn	Gen que participa en la síntesis de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
ArnA	Gen que participa en la síntesis de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
ArnC	Gen que participa en la síntesis de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
ArnD	Gen que participa en la síntesis de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
ATP	Adenosin trifosfato
AtPDF2.3	Defensina 2.3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
Atr-DEF2	Defensina 2 de <i>Amaranthus tricolor</i>
Avr-R	Gen de avirulencia
Bam HI	Enzima de digestión
BcDef1	Defensina de <i>Brugmansia x candida</i>
BS³	Bis-sulfosucinimidil suberato
BSA	Albúmina sérica bovina
B16-F1	Línea celular de tumor murino
CanThio	Tionina de <i>Capsicum annuum</i>
CCCP	Carbonil cianida clorofenil hidrazina
CMV	Citomegalovirus

CDS	Coding sequence (Secuencia codificante)
CS$\alpha\beta$	Dominio alfa-beta estabilizada por cisteínas
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EC₅₀	Media de la concentración efectiva máxima
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
ETI	Effector triggered immunity
ETS	Effector triggered susceptibility
Fe	Hierro
Genes R	Genes de resistencia
GRAVY	Grand Average of Hydropathy
GROMACS	Software GRoningen Machine for Chemical Solutions
GST	Glutación-S-transferasa
G+	Bacterias Gram-positivas
G-	Bacterias Gram-negativas
HBD2	Defensina beta 2 humana
HBD3	Defensina beta 3 humana
HEK293	Células de riñón de embrión humano
HPLC_{FR}	Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
HR	Hypersensitive response
HRP	Peroxidasa de rábano
IC₅₀	Concentración inhibitoria al 50%

IC₉₅	Concentración inhibitoria al 95%
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
ISC	Iron-sulfur cluster
J1-1	Defensina de <i>Capsicum chinense</i> J1-1
K⁺	Ion potasio
kDa	Kilodalton
Kv1.2	Canal de potasio dependiente de voltaje 1.2
Kv1.6	Canal de potasio dependiente de voltaje 1.6
LB	Medio Luria-Bertani
LDM	Lisis de membrana
LD₅₀	Dosis letal media
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfolina
MA	Modos de acción
MCF-7	Células de cáncer de mama
MD	Molecular dynamics
MDC	Complejo de disrupción de membrana
MDR	Multi-drug resistance
MEG	Genes expresados maternalmente
MHB	Medio Mueller-Hinton
MIC	Concentración mínima inhibitoria

MIC₅₀	Concentración mínima que inhibe el 50% del crecimiento de un organismo
MsDef1	Defensina 1 de <i>Medicago sativa</i>
MtDef4	Defensina 4 de <i>Medicago truncatula</i>
MtDef5	Defensina 5 de <i>Medicago truncatula</i>
NaCl	Cloruro de sodio
NaD1	Defensina 1 de <i>Nicotiana glauca</i>
NB-LRR	Nucleotide binding Leucine rich repeat
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético acoplado a níquel
NoD137	Defensina de <i>Nicotiana occidentalis</i>
NPC	1-N-fenilnaptilamina
ns	Nanosegundos
nsLTPs	Proteínas de transferencia de lípidos
NsD7	Defensina de <i>Nicotiana glauca</i>
PA	Ácido fosfatídico
PE	Fosfatidiletanolamina
PC	Fosfatidilcolina
PaDef	Defensina de <i>Persea americana</i>
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern
pH	Potencial de hidrógeno
PhD1	Defensina 1 de <i>Petunia hybrida</i>
PhD2	Defensina 2 de <i>Petunia hybrida</i>

PhoP/PhoQ Sistema regulatorio de dos componentes en bacterias Gram-negativas

PI Fosfatidilinositol

PIs Fosfoinosítidos

PIP Fosfatidilinositol monofosfato

PIP₂ Fosfatidilinositol bisfosfato

PIP₃ Fosfatidilinositol trisfosfato

PI (3) P Fosfatidilinositol-3-fosfato

PI (4) P Fosfatidilinositol-4-fosfato

PI (5) P Fosfatidilinositol-5-fosfato

PI (3,4) P₂ Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato

PI (3,5) P₂ Fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato

PI (4,5) P₂ Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PI (3,4,5) P₃ Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

PmrA/PmrB Sistema regulatorio de dos componentes bacteriano

POPC 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

PR Pathogenesis related protein

PRRs Pattern recognition receptors

PS Fosfatidilserina

Pst I Enzima de restricción

PTI PAMP triggered immunity

PvD1 Defensina de *Phaseolus vulgaris*

PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PVY	Virus Y de la papa
RAW 264.7	Línea celular murina de macrófagos
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT	Retention time
SARS-CoV-2	Virus perteneciente a la familia de los coronavirus
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide
StSN2	Defensina de <i>Solanum tuberosum</i>
SUF	Sulfur formation
S1P	Esfingosina-1-fosfato
TA	Temperatura ambiente
TBS	Amortiguador de Tris salino
TEM	Transmission electron microscopy
THP-1	Línea celular de leucemia monocítica
TPP3	Defensina de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomato pistil-predominant 3)
UFCs	Unidades formadoras de colonias
VuDef	Defensina de <i>Vigna unguiculata</i>

WHO	World Health Organization
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranósido
μM	Micromolar
μs	Microsegundos

RESUMEN

En años recientes, el surgimiento de cepas bacterianas con resistencia múltiple a antibióticos ha alertado a los programas de monitoreo epidemiológico. En respuesta, se ha incentivado el desarrollo de programas para la obtención de nuevos agentes de control. Las defensinas de plantas tienen el potencial para ser utilizadas en tratamientos que puedan ayudar al control de agentes infecciosos. No obstante, la transición de ensayos preliminares *in vitro* a ensayos clínicos es muy baja. Entre los principales obstáculos se encuentra la falta de información sobre sus mecanismos de acción. En la última década, el análisis de estructuras cuaternarias de complejos defensina-lípido, ha permitido la identificación de determinantes estructurales en las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, y su papel en la actividad antimicrobiana a través de ensayos de estructura-función. Paralelamente, diferentes modos de acción antibacterianos o antifúngicos han sido reportados, y la mayoría involucra la interacción entre defensinas y ligandos lipídicos, por lo que el análisis estructural es también necesario para entender como estos péptidos matan a bacterias y hongos. En este trabajo, se diseñaron tres mutantes con cambios en motivos localizados en el N-terminal, C-terminal y en el γ -core de la defensina J1-1. Se observaron perfiles de unión a lípidos diferentes en cada mutante en comparación con el perfil de unión de J1-1. Además, se determinó la actividad antibacteriana de la mutante J1-1_K45E en términos de concentración mínima inhibitoria y unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En comparación con J1-1, la cual fue previamente obtenida de manera recombinante en el grupo de trabajo, J1-1_K45E desplegó una mejor actividad sobre *P. aeruginosa* y adicionalmente mostró actividad sobre *S. aureus*. Además de la actividad antibacteriana se observaron cambios en los perfiles de oligomerización de J1-1 y J1-1_K45E en presencia o ausencia de PA o NaCl. Con los datos obtenidos de los distintos análisis realizados en este trabajo, se concluyó que tanto en J1-1 como en J1-1_K45E, el residuo en la posición 45 participa en la selectividad de unión a fosfolípidos *in vitro*, y en su actividad antibacteriana sobre las cepas evaluadas.

ABSTRACT

In recent years, the emergence of bacterial strains with multiple resistance to antibiotics has alerted epidemiological monitoring programs. In response, the development of programs to obtain new control agents has been encouraged. Plant defensins have the potential to be used in treatments that can help control infectious agents. However, the transition from preliminary *in vitro* trials to clinical trials is very low. Among the main obstacles is the lack of information about its mechanisms of action. In the last decade, the analysis of quaternary structures of defensin-lipid complexes has allowed the identification of structural determinants in protein-protein and protein-lipid interactions, and their role in antimicrobial activity through structure-function assays. In parallel, different antibacterial or antifungal modes of action have been reported, and most involve the interaction between defensins and lipid ligands, so structural analysis is also necessary to understand how these peptides kill bacteria and fungi. In this work, three mutants were designed with changes in motifs located in the N-terminal, C-terminal and in the γ -core of defensin J1-1. Different lipid binding profiles were observed in each mutant compared to the binding profile of J1-1. Furthermore, the antibacterial activity of the J1-1_K45E mutant was determined in terms of minimum inhibitory concentration and colony-forming units of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Compared to J1-1, which was previously obtained recombinantly in the working group, J1-1_K45E displayed better activity on *P. aeruginosa* and also showed activity on *S. aureus*. In addition to the antibacterial activity, changes in the oligomerization profiles of J1-1 and J1-1_K45E were observed in the presence or absence of PA or NaCl. With the data obtained from the different analyzes carried out in this work, it was concluded that in both J1-1 and J1-1_K45E the residue in position 45 participates in the selectivity of binding to phospholipids *in vitro*, and in its antibacterial activity on the strains evaluated.

INTRODUCCIÓN

Plantas y microorganismos fitopatógenos han coexistido a lo largo del tiempo; derivado de la interacción y la evolución, estos organismos han desarrollado mecanismos que les permiten prevalecer en la interacción. Por un lado, los microorganismo patógenos deben de ser capaces de evadir las barreras físicas y los mecanismos moleculares de defensa de las plantas con el objetivo de cumplir con su ciclo infecto-reproductivo (Jones y Dangl, 2006). En contraste, las plantas deben defenderse en contra de una amplia variedad de microorganismos fitopatógenos que las amenazan constantemente y que pueden afectar su fisiología y generar daños irreversibles. Las plantas pueden adaptar múltiples estrategias que les permiten encarar y subsistir ante la presencia de agentes causantes de estrés biótico y abiótico, entre dichas estrategias, se encuentran las barreras físicas y la expresión de genes, así como la producción de metabolitos (fitoanticipinas o fitoalexinas) o proteínas como los PRR (por sus siglas en inglés, Pathogen Recognition Receptor), PR (por sus siglas en inglés, Pathogenesis Related Proteins) y R (Resistance Genes). En general, el objetivo de estas proteínas es ayudar en la defensa de la planta a través de la detección del microorganismo invasor, y la subsecuente respuesta específica para detenerlo o eliminarlo (Nguyen *et al.*, 2021).

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., se genera conocimiento a nivel bioquímico y molecular de mecanismos asociados a estrés biótico y abiótico en una variedad de modelos vegetales para entender y buscar soluciones a problemas que afecten el rendimiento vegetal. Uno de los modelos de estudio es la especie *Capsicum chinense* o mejor conocida como chile habanero. Esta especie, es de gran importancia para la península de Yucatán desde varios aspectos como el histórico, social, cultural y el económico (Ramírez-Meraz *et al.*, 2024). Debido a las características organolépticas, nutricionales y terapéuticas del fruto, su uso se ha diversificado en la industria química, alimentaria y farmacéutica. A propósito de las bondades terapéuticas del fruto, Chichewicz y Thorpe (1996), demostraron la actividad de extractos cocidos de chile habanero y otras especies del género *Capsicum* ante una variedad de 15 especies de bacterias y una especie de levadura.

Adicionalmente, entre la amplia variedad de moléculas producidas por las plantas en condiciones de estrés abiótico o biótico, se encuentran las defensinas, las cuales forman parte de la gran familia de péptidos antimicrobianos o AMPs, de *Anti-Microbial Peptides* (Tam *et al.*, 2015). El reino vegetal es un reservorio natural de compuestos con amplia variedad de actividades biológicas, no obstante, algunas moléculas que presentan actividad antimicrobiana, generan un

particular interés, debido a la necesidad actual de encontrar nuevos agentes con mayor efectividad para su potencial uso en el tratamiento de enfermedades generadas por microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos. Entre las moléculas que cumplen con dichos requerimientos, se encuentran las defensinas de plantas. Las defensinas de plantas, son péptidos catiónicos, ricos en cisteínas, conformados por 45-54 aminoácidos, con algunas excepciones como la defensina bidominio MtDef5 (107 aminoácidos). Desafortunadamente, la falta de conocimiento acerca de sus respectivos modos de acción, limita su potencial uso como agentes antimicrobianos (Greco *et al.*, 2020; Xu y Lu, 2020).

J1-1 es una defensina de 48 aminoácidos expresada en *Capsicum annumm*. Su actividad antifúngica en *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* fue caracterizada previamente (Meyer *et al.*, 1996); en plantas genéticamente modificadas de *Capsicum annumm*, su sobreexpresión redujo el daño en frutos asociado a *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras que el péptido recombinante fusionado a GST (GST-J1-1) inhibió *in vitro* la formación de aporosios de *C. gloeosporioides* (Seo *et al.*, 2014). Por otra parte, la sobreexpresión tejido-específica de J1-1 en tabaco, anuló los síntomas asociados y el crecimiento de hifas de *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*, en paralelo, GST-J1-1 recombinante inhibió *in vitro* el crecimiento de ambos microorganismos (Lee *et al.*, 2018). En nuestro grupo de trabajo, la secuencia codificante para el péptido maduro de J1-1, amplificado a partir de ADN genómico de *Capsicum chinense* se clonó y se obtuvo de forma recombinante fusionado a una etiqueta de histidinas (6His-J1-1), en ensayos *in vitro*, se caracterizó su perfil de unión a fosfolípidos donde la unión más fuerte fue hacia ácido fosfatídico (PA), además el péptido denominado HisXarJ1-1 mostró actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* (Guillén-Chable *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, se generaron un grupo de defensinas mutantes derivadas del péptido J1-1, la mutante (J1-1_K45E) cuyo constructo fue obtenido previamente en el grupo de investigación, fue incluida. Las mutantes de la defensina J1-1 denominadas J1-1_KTE (Modificación en el N-terminal), J1-1_DEF4 (Modificación en la región del γ -core) y J1-1_K45E (Modificación en el C-terminal), se diseñaron con base en el análisis de las estructuras reportadas por cristalografía de rayos X de complejos oligoméricos defensina-lípido de solanáceas como NaD1-PA, NsD7-PA y NaD1-PIP₂ (Järvå *et al.*, 2017, 2018; Kvensakul *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2014). Mediante la metodología previamente establecida en el grupo de trabajo, se realizó la expresión y se purificaron las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión en los casos de J1-1 y J1-1_K45E. Las defensinas mutantes J1-1_KTE y J1-1_DEF4, fueron purificadas a partir de la fracción soluble por cromatografía de afinidad a níquel. Particularmente, la defensina

modificada en el extremo C-terminal de J1-1, con un cambio de la lisina 45 por glutamato (K por E) presentó un perfil de oligomerización distinto a J1-1, el cambio generado modificó su selectividad a fosfolípidos y su actividad antibacteriana. Los datos experimentales obtenidos en este trabajo, permitieron la identificación de nuevas determinantes estructurales en J1-1 que participan en la modificación del reconocimiento a fosfolípidos y en la modulación de su actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Los microorganismos fitopatógenos son agentes biológicos que afectan la fisiología de las plantas provocándoles enfermedades que pueden llevarlas incluso a la muerte. Este suceso es preocupante, pero aún más cuando el fenómeno se presenta en cultivos de interés agronómico, pues reducen su calidad y producción provocando la disminución de la disponibilidad de dichos productos para los consumidores finales, amenazando así a nuestra soberanía alimentaria. Como organismos sésiles, las plantas no pueden desplazarse físicamente de un lugar a otro y con ello evitar el ataque de ciertos microorganismos, no obstante, evolutivamente han generado estructuras y mecanismos que les permiten defenderse en contra de los fitopatógenos. Entre los mecanismos de defensa generados, se encuentran los constitutivos, donde podemos encontrar a la pared celular, la cual no solo proporciona cuerpo y soporte, sino además actúa como barrera contra estrés biótico y abiótico (Malinovsky *et al.*, 2014). Adicionalmente otras estructuras y moléculas juegan un papel importante en la protección contra microorganismos patógenos, como son la cutícula, tricomas, callosa, compuestos fenólicos, compuestos orgánicos volátiles, AMPs, etc., (Maurya, 2020; Pacheco-Cano *et al.*, 2020; Malinovsky *et al.*, 2014). Por otra parte, se encuentran los mecanismos de defensa inducidos, descritos por (Jones y Dangl, 2006) en respuesta al ataque de microorganismos o agentes fitopatógenos. El modelo descrito por Jones y Dangl es conocido como el modelo del “Zig-Zag”, y describe cuatro fases involucrando dos niveles de acción: la inmunidad disparada por PAMP o PTI (por sus siglas en inglés, PAMP-triggered immunity) y la inmunidad disparada por efectores o ETI (por sus siglas en inglés, Effector-triggered immunity). De manera general, en la fase 1 los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (por sus siglas en inglés, Pathogen-associated molecular patterns) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones o PRRs (por sus siglas en inglés, Pattern-recognition receptors), lo cual resulta en una PTI, acción que puede detener la colonización del hospedero. En la fase 2, los patógenos adaptados evolutivamente producen efectores que contribuyen a la virulencia y patogenicidad, dichos efectores, pueden apagar o bloquear a la PTI ocasionando así una susceptibilidad disparada por efector o ETS (por sus siglas en inglés, Effector-triggered susceptibility). En la fase 3, el efector es específicamente reconocido por proteínas con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótido o NB-LRR (por sus siglas en inglés, Nucleotide-binding leucine-rich repeat), lo cual genera una ETI que resulta

en resistencia a la enfermedad y usualmente se manifiesta en forma de la respuesta hipersensible o HR (por sus siglas en inglés, Hypersensitive Response) en el sitio de infección. En la fase 4, la evolución ha dado lugar a que los patógenos eviten la ETI a través de la diversificación o modificación de los efectores previamente reconocidos, o adquiriendo efectores adicionales que supriman la ETI. La misma selección natural permite que surjan nuevos genes tipo NB-LRR de modo que la ETI puede ser generada nuevamente (Figura 1.1) (Jones y Dangl, 2006).

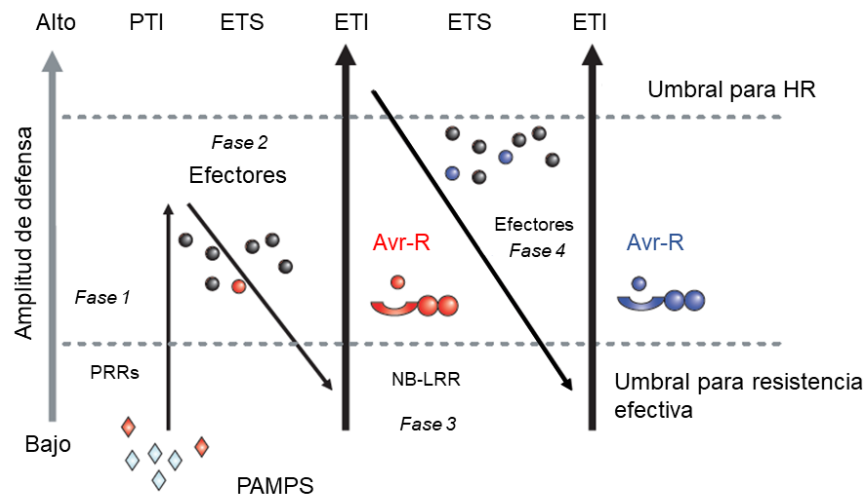


Figura 1.1. Modelo Zig-Zag. En la fase 1, los PRRs de las plantas detectan los PAMPs de los patógenos y encienden la PTI. En la fase 2, los patógenos generan efectores que interfieren con la PTI, lo cual resulta en ETS. En la fase 3, un efector (rojo) es reconocido por una proteína tipo NB-LRR, activando así la ETI. En la fase 4, algunos patógenos generan variantes de efectores o nuevos efectores, para bloquear la ETI. Durante el proceso evolutivo de la interacción, las plantas producirán nuevas proteínas NB-LRR que reconozcan al efector modificado o nuevo, activando de nuevo la ETI. Modificado de Jones y Dangl, (2006).

1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS VEGETALES

El reino vegetal, es un reservorio natural de compuestos con amplia variedad de actividades biológicas, de entre ellos, las moléculas con actividad antimicrobiana han generado profundo interés dada la búsqueda de nuevos y efectivos métodos de control contra patógenos de plantas, animales y humanos. Las afectaciones en agricultura están bien documentadas, por ejemplo, los microorganismos patógenos de plantas generan mermas de más del 30% de los cultivos previo o después de la cosecha, lo cual causa pérdidas económicas y más alarmante aún, menor producción de alimentos (Jones *et al.*, 2016).

Los primeros conocimientos en herbolaria y el potencial medicinal de algunas plantas, proviene de documentos antiguos, lo cual es parte de la riqueza cultural e histórica, obra de pueblos indígenas alrededor del mundo, quienes usaron plantas como fuente de agentes medicinales para curar muchos de sus padecimientos (Cichewicz y Thorpe, 1996).

Históricamente, el modo de tratar las infecciones cambió a partir del descubrimiento de la penicilina en septiembre de 1928 por Sir Alexander Fleming (Aminov, 2010). Desde entonces una gran cantidad de antibióticos fueron descubiertos (Etebu y Ariekpar, 2016), iniciando con ello la denominada “era dorada de los antibióticos”, período comprendido entre 1930 y 1970 (Aslam *et al.*, 2018; Aminov, 2010). Gran parte de los antibióticos existentes y usados actualmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas, fueron descubiertos en el periodo de la era dorada de los antibióticos. Contrario a toda lógica que indicaría la existencia de un amplio arsenal de antibióticos, resulta una realidad totalmente diferente, pues la necesidad de obtener nuevos antibióticos es urgente (Wyatt, 2019; Aslam *et al.*, 2018; Tacconelli *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista farmacológico el número de plantas explorado aún es muy pequeño. Se estima que en el planeta, existen alrededor de 265,000 especies con flores, de las cuales menos de la mitad del 1% han sido analizadas a nivel de composición química y valor medicinal (Cox, 1994). Por otra parte, las infecciones microbianas causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos, siguen siendo causas importantes de mortalidad y morbilidad en humanos (Wyatt, 2019).

En paralelo al descubrimiento y caracterización de antibióticos, un gran número de trabajos fueron publicados describiendo actividad antimicrobiana en extractos de plantas, plantas cuyos orígenes se ubican en diversas regiones del mundo (Penecilla y Magno, 2011; Soetarno *et al.*, 1997; Cichewicz y Thorpe, 1996; Caceres *et al.*, 1991; Mitscher *et al.*, 1980; Abdou *et al.*, 1972; Al-Delaimy y Ali, 1970; MacDonald y Bishop, 1953; Lucas *et al.*, 1951; Bushnell *et al.*, 1950; Gottshall y Lucas, 1949). Cichewicz y Thorpe, (1996) demostraron la actividad antimicrobiana de extractos cocidos y crudos de *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens* contra 15 especies de bacterias y una especie de levadura; por otra parte Soetarno *et al.* (1997) demostraron la actividad antimicrobiana de extractos de *Capsicum frutescens*, y dos especies de *Capsicum annuum* en contra de bacterias Gram-positivas (G+), Gram-negativas (G-) y hongos. De acuerdo a los autores, la actividad de los extractos fue similar en términos de actividad antimicrobiana, aunque sus niveles de capsaicina fueron diferentes. Un análisis de cromatografía de capa fina confirmó que la

capsaicina fue el principal agente antimicrobiano, no obstante, dos componentes de naturaleza no polar fueron también identificados y propuestos como los responsables de la actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

En otro trabajo se caracterizaron 12 extractos de plantas usadas en la medicina tradicional filipina. En búsqueda de actividad antimicrobiana, los extractos se probaron contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, diez de los 12 extractos inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Penecilla y Magno, 2011). Actualmente, los avances en las diversas técnicas de análisis bioinformático, bioquímica, biología molecular y biotecnología, han hecho posible identificar, clasificar, obtener y caracterizar una gran variedad de moléculas de origen vegetal con potencial uso clínico, veterinario o agronómico (Wei *et al.*, 2019; Ramada *et al.*, 2017).

1.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

Los péptidos antimicrobianos, se encuentran distribuidos en todos los dominios de la vida (Tam *et al.*, 2015; Pushpanathan *et al.*, 2013). Generalmente, los AMPs de plantas presentan propiedades como antibióticos, similares a AMPs de microbios, insectos y animales (Tam *et al.*, 2015). Entre las características comunes se encuentran: sus estructuras tridimensionales, que contienen una mayor cantidad de aminoácidos con carga positiva y su naturaleza anfipática. Estas características son importantes para su actividad como antifúngicos, antivirales y antibacterianos. Los AMPs de plantas, son ricos en residuos de cisteína, por lo que forman múltiples enlaces disulfuro, característica que les confiere estabilidad química, térmica y proteolítica. La clasificación de los miembros de esta familia se basa en la similitud de secuencia, número y posición de los residuos de cisteína que determinan los patrones de enlaces disulfuro y su estructura tridimensional. Aún con estas características comunes es posible encontrar distintas estructuras tridimensionales, los motivos estructurales de los péptidos antimicrobianos de plantas, son: plegamiento gama (β 1- α 1- α 2- β 2-coil), plegamiento CS α β (β 1-coil- α - β 2- β 3), péptidos ricos en glicina y cisteínas con β -plegadas centrales y hélices cortas, β -plegadas cortas y hélices (knot cisteína), cavidad hidrofóbica (α 1- α 2- α 3- α 4-hélice), plegamiento α 1-giro- α 2 y α -hélices para tioninas, defensinas, heveinas, knottins, proteínas de transferencia de lípidos, α -hairpinin y snakinas respectivamente (Figura 1.2) (Tam *et al.*, 2015).

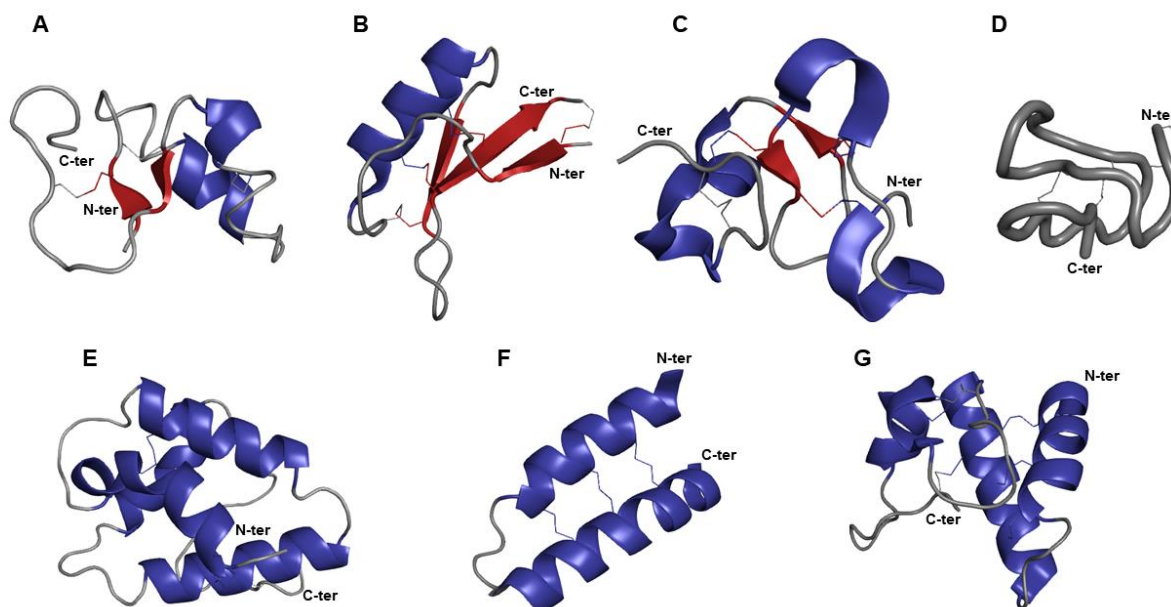


Figura 1.2. Estructuras tridimensionales de péptidos antimicrobianos de plantas. A) Tioninas, B) defensinas, C) péptidos tipo heveina, D) péptidos tipo knottin, E) proteínas de transferencia de lípidos, F) péptidos α -hairpinin y G) snakinas. Código de color: en rojo, hojas β y en azul α -hélices. Códigos PDB: A) 1AB1, B) 4AAZ, C) 1Q9B, D) 5GSF, E) 1BWO, F) 2NB2 y G) 5E5Q.

1.3.1. Mecanismo general de acción de los AMPs

La expresión de los AMPs de plantas es constitutiva o inducida, y a menudo específica de algún tejido (Pothana *et al.*, 2019; Tam *et al.*, 2015). Los mecanismos generales mediante los cuales los AMPs ejercen su actividad, se pueden clasificar en dos principales: 1) los que afectan a membranas de las células blanco, donde inducen la lisis o daño celular debido a la disrupción de la membrana y; 2) los que principalmente afectan a procesos intracelulares donde pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, procesos enzimáticos esenciales o la síntesis de otras proteínas (Erdem Büyükkiraz y Kesmen, 2022; Tam *et al.*, 2015; Pushpanathan *et al.*, 2013; Lobo *et al.*, 2007; Brogden, 2005). Los mecanismos propuestos para la disrupción de las membranas plasmáticas por AMPs, pueden clasificarse en mecanismos independientes de energía (Modelo de barril, poro toroidal y carpeta) o dependientes de energía (micropinocitosis, endocitosis) (Pushpanathan *et al.*, 2013) (Figura 1.3).

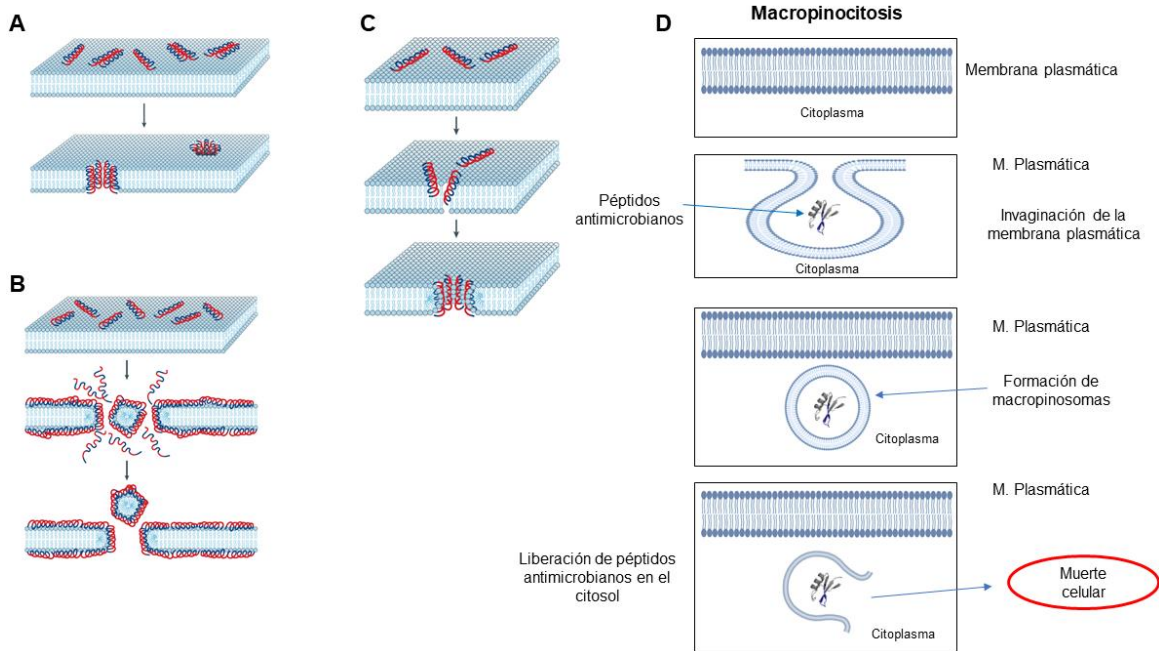


Figura 1.3. Mecanismos de permeabilización de membranas de AMPs. A) Modelo barril; B) Modelo carpeta; C) Modelo toroide; D) Macropinocitosis. Adaptado y modificado de Brogden, (2005).

Además de inducir la ruptura de la membrana lipídica, los AMPs pueden formar estructuras en la membrana similares a canales iónicos, mismas que pueden inducir la liberación de iones (e.g., K^+) lo que resulta en la inhibición del crecimiento celular o muerte celular (Tam *et al.*, 2015). También se ha observado que los AMPs pueden despolarizar la membrana interna y reducir la concentración de ATP citosólico (Brogden, 2005). En uno de los reportes más recientes de mecanismos de entrada para una defensina vegetal, se demostró que NaD1 (defensina de *Nicotiana glauca*) es internalizada después de su interacción con componentes de la membrana de *Candida albicans* por endocitosis (Hayes *et al.*, 2018).

1.4. DEFENSINAS DE PLANTAS

Las defensinas de plantas forman parte de la superfamilia de los AMPs. Estos péptidos se caracterizan por su naturaleza catiónica, poseen de 8 a 10 residuos de cisteínas y están conformados por 45 a 54 aminoácidos. Estructuralmente, se les relaciona con defensinas de mamíferos, de insectos y de hongos (van der Weerden y Anderson, 2013; Carvalho y Gomes, 2009). Sus pesos moleculares van de entre los 5 a los 7 kDa, y su estructura tridimensional consiste de un plegamiento tipo $CS\alpha\beta$ (alfa-beta estabilizado por cisteínas), caracterizado por

una α -hélice y tres hojas β antiparalelas (Figura 1.4) (Ishaq *et al.*, 2019). De acuerdo a Kerenga *et al.* (2019) dicho plegamiento CS α β le proporciona estabilidad a la molécula en condiciones de pH extremo, temperaturas elevadas y en presencia de proteasas, además, este plegamiento está estrechamente relacionado con péptidos que muestran actividad antimicrobiana (Carvalho y Gomes, 2009).

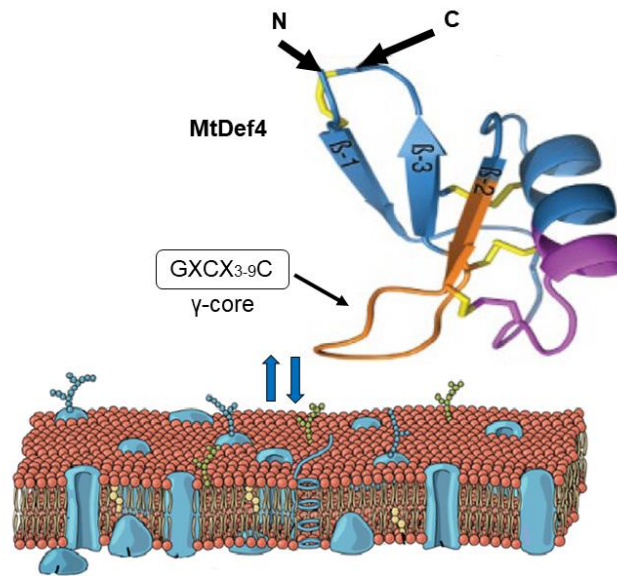


Figura 1.4. Interacción MtDef4 vs membrana plasmática. N, región amino terminal de MtDef4; C, región carboxilo terminal de MtDef4; GxCX₃₋₉C, región correspondiente al γ -core, donde X puede ser cualquier aminoácido; parte inferior, membrana plasmática. Modificado de Radhajeyalakshmi *et al.* (2020).

Las cisteínas en las defensinas de plantas se encuentran conservadas (ocho cisteínas, siendo PhD1 y PhD2 las excepciones con diez residuos), estos residuos forman de cuatro a cinco enlaces disulfuro, con el siguiente orden descrito: Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 y Cys4-Cys7 (Ishaq *et al.*, 2019). Respecto a las defensinas de plantas con cinco enlaces disulfuro, se conoce que el enlace extra no influye en la estructura tridimensional (Ishaq *et al.*, 2019). Además, de los ocho residuos de cisteína conservados, en defensinas de plantas, lo que representa un 17% de identidad de secuencia (Francisco y Georgina, 2017) considerando un péptido de 47 residuos, las defensinas muestran un porcentaje de identidad bajo. De acuerdo a Kovaleva *et al.* (2020), la identidad en las secuencias de amino ácidos de las defensinas varía entre menos del 35% a más de 90%, no obstante, los estudios por RMN y cristalografía de rayos X revelan una estructura 3D conservada (Li *et al.*, 2019; van der Weerden y Anderson, 2013).

De acuerdo a Pinheiro-Aguiar *et al.* (2020), tanto los enlaces disulfuro como las interacciones polares, son las principales fuerzas que confieren la estabilidad del motivo CS $\alpha\beta$, y con ello se generan las condiciones para la exposición de residuos hidrofóbicos, los cuales forman los agrupamientos hidrofóbicos/hidrofílicos característicos de los AMPs. Se conoce que las proteínas globulares, poseen núcleos hidrofóbicos que les permiten manejar las similitudes conformacionales. En el caso de las defensinas de plantas el motivo CS $\alpha\beta$, no posee un núcleo hidrofóbico, no obstante, los autores del citado trabajo proponen que la exposición de residuos hidrofóbicos dispuestos en agrupamientos, forman núcleos hidrofóbicos localizados. La importancia de esto radica en su localización dentro de las asas de la defensina, pues se ha descrito que las asas, además de mostrar mayor variabilidad, contribuyen a la especificidad con sus respectivos ligandos (Pinheiro-Aguiar *et al.*, 2020).

1.4.1. Origen del estudio de las defensinas de plantas

El origen del estudio de las defensinas de plantas se remonta hacia los años 90's cuando una gran cantidad de péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas fueron identificados. El primer reporte de defensinas se hizo a partir del estudio de semillas de trigo (*Triticum turgidum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) (Ishaq *et al.*, 2019; Mendez *et al.*, 1990). Inicialmente las defensinas de plantas fueron clasificadas como "tioninas", específicamente como "γ-tioninas", debido a su gran parecido en secuencia de aminoácidos, tamaño y el número de cisteínas (Cools *et al.*, 2017; Carvalho y Gomes, 2009; Mendez *et al.*, 1990). Sin embargo, estudios posteriores revelaron diferencias significativas respecto al patrón de conformación de los enlaces disulfuro, esto demostró que no había relación alguna entre las tioninas y las recién denominadas "γ-tioninas" (Cools *et al.*, 2017; Carvalho y Gomes, 2009; Bruix *et al.*, 1995). Fue en el trabajo reportado por Terras *et al.* (1995) donde después de una caracterización que incluyó la evaluación de la similitud estructural y funcional con péptidos antimicrobianos identificados en mamíferos e insectos (defensinas), cuando se propuso renombrar a las γ-tioninas como "defensinas de plantas". En la figura 1.5, se muestran algunos de los acontecimientos más relevantes en el área de investigación con defensinas de plantas, que van desde el aislamiento de las primeras defensinas en la década de los 90, hasta la caracterización de estructuras cristalográficas y la elucidación de posibles mecanismos de acción.

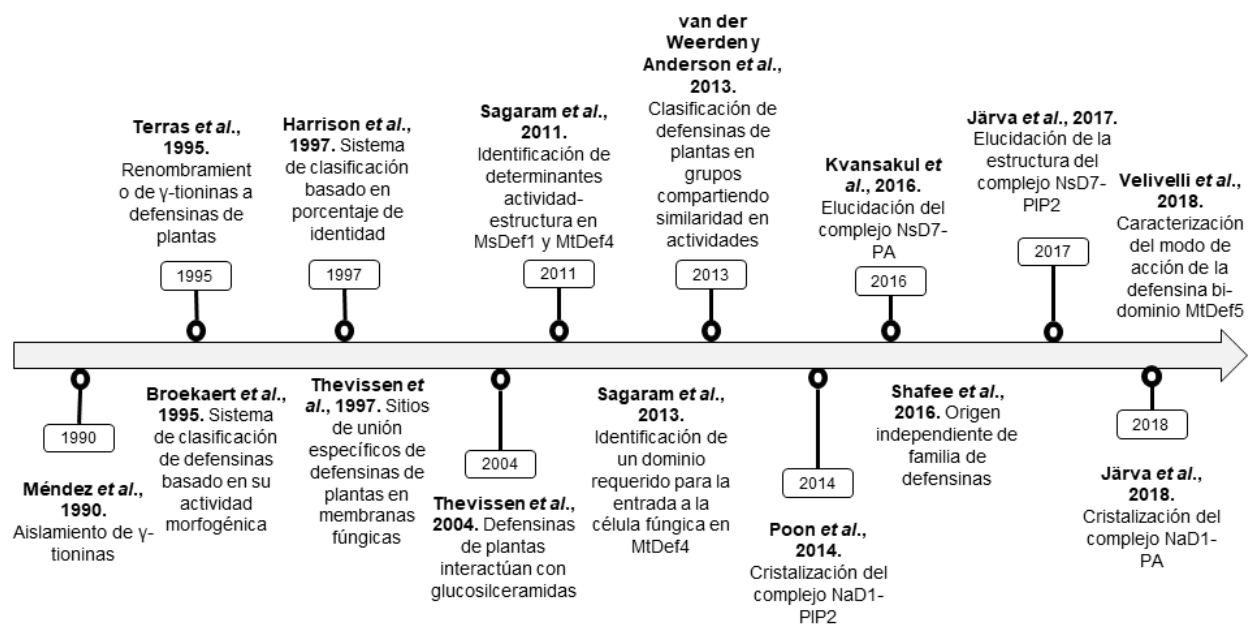


Figura 1.5. Evolución en el tiempo de la investigación en el área de defensinas de plantas.

1.4.2. Modos de acción generales de defensinas de plantas

De acuerdo a Ishaq *et al.* (2019), las defensinas de plantas actúan siguiendo el modelo carpeta y el modelo poro. A continuación, se explica cada uno de ellos: -i) Modelo carpeta, en este modelo los péptidos se acumulan en diversos sitios de la superficie de la bicapa lipídica, a donde llegan debido a la atracción electrostática entre los péptidos con carga catiónica y las cabezas aniónicas de los fosfolípidos de la membrana. En concentraciones altas de péptido, la membrana es abruptamente lisada en una manera similar al efecto de los detergentes, incluso dando lugar a la formación de micelas. -ii) Modelo poro, describe la inserción de las α -hélices en las membranas, donde posteriormente provoca que las monocapas lipídicas, se doblen continuamente a través de una especie de poro-toroide que se forma en la membrana donde la parte polar del poro (cabezas de los lípidos), se encuentra en contacto y alineada con los motivos polares del péptido (Erdem Büyükkiraz y Kesmen, 2022; Ishaq *et al.*, 2019; Sher Khan *et al.*, 2019).

De acuerdo a ambos modelos, las defensinas interactúan con lípidos presentes en la membrana celular de los hongos patógenos (esfingolípidos y fosfolípidos, Cools *et al.*, 2017), acción que induce la permeabilización o liberación de contenido intracelular y su posterior necrosis (Ishaq *et al.*, 2019; Sher Khan *et al.*, 2019). No obstante, algunos reportes proponen un mecanismo alternativo que consiste en la translocación de las defensinas al citosol sin causar daño en la

membrana de los patógenos (Ishaq *et al.*, 2019). Dicha hipótesis, menciona que una vez en el citosol, las defensinas generan permeabilidad elevada de iones en consecuencia de la interacción directa con los fosfolípidos de la membrana interna, lo cual se refleja en el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la inducción de la apoptosis (Ishaq *et al.*, 2019). Actualmente, además de los lípidos, se han descrito componentes citosólicos que son blancos de las defensinas de plantas (Velivelli *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2017).

1.4.2.1. Mecanismos de acción antifúngicos e internalización

Los modos de acción generales, no describen las particularidades observadas para ciertas defensinas con actividad antifúngica, donde el modo de acción puede ser más complejo que solo la permeabilización de la membrana, y donde, además, las variantes estructurales de los péptidos suelen participar en la actividad biológica. Por ejemplo, Sagaram *et al.* (2013) caracterizaron la actividad antifúngica de MtDef4 de *Medicago truncatula* en *Fusarium graminearum* donde observaron que MtDef4 permeabiliza la membrana fúngica, y al hacerlo se acumula en el citosol. Los estudios de la relación estructura-función de MtDef4, indican que el γ -core, definido como la asa entre la lámina $\beta 2$ y $\beta 3$ (RGFRRR) es necesario para que MtDef4 se una a PA *in vitro*, y para que el péptido sea capaz de permeabilizar la membrana y con ello, ejercer su actividad antifúngica. El-Mounadi *et al.* (2016), propusieron mecanismos de acción diferentes de la internalización de MtDef4 en *Neurospora crassa* y *F. graminearum*. MtDef4 inhibió el crecimiento de *N. crassa* y *F. graminearum* a 0.4 μM y 6 μM respectivamente. La permeabilización de las membranas de ambos hongos fue evaluada utilizando las mismas concentraciones de MtDef4, se observó permeabilización en *F. graminearum*, pero no en *N. crassa*, por lo que se determinó que, aunque MtDef4 puede translocarse al interior de ambas células, este lo hace de manera distinta siguiendo un mecanismo parcialmente dependiente de energía en *F. graminearum* y un mecanismo dependiente de energía para *N. crassa* (endocitosis).

Por otra parte Vriens *et al.* (2016) determinaron que la defensina de *Arabidopsis thaliana* AtPDF2.3, tiene una MIC de 1.4 μM en *Fusarium graminearum*. El análisis *in silico* determinó la presencia de una firma característica y presente en toxinas de escorpión, debido a esto, se determinó la actividad inhibitoria de AtPDF2.3 sobre canales iónicos. AtPDF2.3 bloquea físicamente los canales de potasio Kv1.2 y Kv1.6. Es interesante que la actividad sobre los canales de potasio, no correlaciona con su actividad inhibitoria sobre *F. graminearum*, hecho que se observó tras contrastar los efectos de AtPDF2.3 WT y algunas mutantes.

Una de las defensinas más estudiadas es NaD1 de *Nicotiana glauca*, Hayes *et al.* (2018) estudiaron el mecanismo mediante el cual NaD1 entra a células de *Candida albicans* utilizando ensayos curso temporales con NaD1 acoplada a un fluoróforo (BODIPY). NaD1 se acumula inicialmente en la superficie celular, donde permanece por un promedio de 4 minutos, posteriormente, NaD1 se localiza en la periferia del citoplasma y después de 0.67 minutos se observa en todo el citoplasma, de forma paralela, se detectó que para este momento los organelos habían comenzado a desintegrarse.

En ese trabajo también se utilizó un desacoplador de la fosforilación oxidativa (CCCP) para evaluar si la entrada de NaD1 era o no dependiente de energía. Se observó disminución de la internalización de NaD1 en células de *C. albicans*, por lo que se concluyó que el proceso de internalización al citoplasma era dependiente de energía, siguiendo este resultado, también se evaluó si la endocitosis era el mecanismo de internalización de NaD1, por lo que células fueron tratadas con Latrunculina A, la cual bloquea la polimerización de actina a filamentos, un paso que es crítico para la endocitosis en levaduras (Hayes *et al.*, 2018).

Los resultados sugirieron que la endocitosis es el mecanismo principal, pero no el único por el que NaD1 entra a la célula dado que el tratamiento con Latrunculina A, no protegió a las células de la toxicidad generada por NaD1. En ese sentido, se discutió que, a concentraciones mayores a 3.5 μM de NaD1 ocurre endocitosis, a una concentración suficiente para generar daño celular, por otra parte, al usar concentraciones altas de proteínas, se pudo haber dañado directamente la membrana ocasionando así la disrupción transitoria de la bicapa lipídica, efecto que permitió la entrada de NaD1 al citoplasma. Además, el desplazamiento de NaD1 a través de la célula parece no ser dependiente del sistema endosomal interno, tal como se demostró con el uso del nocodazol y la delección de componentes del sistema ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) para alterar la sensibilidad a NaD1. Finalmente, NaD1 parece no asociarse a ningún organelo, en lugar de ello, se difunde a través de todo el citoplasma (Hayes *et al.*, 2018).

1.4.2.2. Mecanismos de acción antibacterianos de defensinas de plantas

La actividad antibacteriana de defensinas de plantas genera mucho interés principalmente cuando el efecto es descrito sobre bacterias patógenas de plantas y animales. Curiosamente, aunque existe una cantidad importante de trabajos describiendo dicha actividad, pocos son los reportes que describen sus modos de acción (Velivelli *et al.*, 2018). En la actualidad, existe una

creciente necesidad de obtener agentes que ayuden en el control de enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Aslam *et al.*, 2018), por lo que profundizar en la caracterización de sus modos de acción se está convirtiendo en un tema de investigación cada vez más importante.

Velivelli *et al.* (2018), caracterizaron la actividad antibacteriana de la defensina MtDef5 y sus dos dominios (MtDef5A y MtDef5B) en las cepas bacterianas *Xanthomonas campestris* (Gram negativa) y *Clavibacter michiganensis* (Gram positiva). A través de ensayos con yoduro de propidio, y microscopia confocal, se observó que las células bacterianas tratadas con defensinas perdieron su viabilidad, además, se concluyó que MtDef5 y sus dominios independientes inducen cambios morfológicos distintos en las células de *X. campestris* e inducen la muerte celular. Mediante análisis de microscopia con los péptidos unidos a DyLight550, se demostró que la defensina bidominio MtDef5 y el dominio MtDef5B penetraron la membrana celular y se acumularon en el citoplasma de *X. campestris*. El dominio MtDef5B, causó daño considerable en la membrana, provocando la liberación de contenido celular y agregación celular. En el ensayo de retardamiento en gel, se observó que MtDef5 se une al ADN de *X. campestris* y a ADN plasmídico. Los autores proponen como modo de acción, para MtDef5 y sus dos dominios de defensina, la interacción electrostática *in vivo* con el ADN (cargado negativamente). Si la interacción con el ADN causa la inhibición de la replicación del ADN o la transcripción *in vivo*, esto aún no ha sido explorado.

La membrana plasmática es el sitio de interacción inicial de las defensinas, reconociendo a los lípidos constituyentes de la bicapa lipídica en distintos tipos celulares (Tam *et al.*, 2015). En relación a la información sobre los mecanismos de acción de defensinas de plantas antibacterianas, aún no hay suficientes ensayos descritos respecto a su dinámica al entrar en contacto con las membranas.

Nikte *et al.* (2020) reportaron el efecto inhibitorio de los péptidos de *Capsicum* clasificados como tioninas, CanThio en las líneas celulares humanas KEK293 y MCF-7. CanThio3 mostró la más alta inhibición sobre el crecimiento celular de MCF-7 a 1.15 μM y mostró citotoxicidad mínima sobre células HEK293. Es interesante el hecho que, en ese trabajo, se realizaron simulaciones de dinámica molecular MD (Molecular Dynamics) con CanThio3. Dado que CanThio3 mostró la citotoxicidad más alta sobre células cancerígenas, las simulaciones se realizaron con una bicapa POPC (1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA). Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en GROMACS 5.0. Para examinar las interacciones del péptido CanThio3 con la bicapa de POPC, la distancia mínima entre el péptido y la membrana fue

graficada sobre el tiempo de simulación. Se observó que inicialmente (arriba de 700 ns) el péptido tuvo interacciones con la membrana. Después de 700 ns, el péptido interactuó continuamente con la membrana hasta el final del tiempo de simulación de 1 μ s.

Se observó que los residuos del 8 al 18 y del 36 al 41 pertenecientes al α -core y γ -core interactuaron con la membrana. Los residuos del 53 al 61 en el C-terminal participaron en la interacción breve hacia el final de las simulaciones. Los residuos A11, V12, I13, I38 y L39 formaron interacciones de Van der Waals con las colas no polares de los lípidos mientras los residuos R40 y K41 tuvieron interacciones polares con los grupos de lípido. R40 mostró interacciones máximas con la bicapa lipídica y es en efecto, un residuo importante para las interacciones con la membrana.

De acuerdo a los autores, dicha observación se comparó con la estructura tridimensional de NaD1 unida a PA, donde R39 (en posición equivalente a R40 de CanThio3) fue observado por ser crítico para la unión a PA, para su oligomerización y para la inducción de la muerte celular. Los cálculos de potencial electrostático en CanThio3 revelaron que las regiones cercanas al γ -core y C-terminal tienen un potencial positivo. Por lo tanto, las interacciones electrostáticas probablemente dirigen la atracción de CanThio3 a la bicapa. Además, basados en las observaciones de simulación de trayectoria, el contacto inicial de CanThio3 con la membrana es propiciado por residuos hidrofóbicos del α - y γ -core, y eventualmente los residuos positivos interactúan con la cabeza de los lípidos cargados negativamente. Los autores señalan que la interacción estable de CanThio3 con la bicapa lipídica causa la disrupción local de la membrana, lo cual lleva a cambios en su grosor. Para caracterizar la perturbación de la membrana durante la interacción membrana-proteína, el promedio de grosor de membrana fue graficado. Se determinó que la región correspondiente al contacto proteína-membrana parece tener más adelgazamiento que las regiones cercanas (alrededor), una indicación temprana de perturbación de membrana. Las simulaciones de CanThio3 con la membrana modelo revelaron que los residuos cargados positivamente e hidrofóbicos pertenecientes al α - y γ -core de los péptidos son responsables de las interacciones membranolíticas relacionadas con la actividad biológica del péptido (Nikte *et al.*, 2020).

1.5. DEFENSINA J1-1

J1-1 es una defensina de clase I, el gen reportado inicialmente en *Capsicum annuum* codifica para un péptido de 75 aminoácidos y se expresa en frutos. J1-1, contiene un péptido señal de 27

aminoácidos, y una región madura de 48 residuos aminoacídicos, de los cuales, ocho residuos son cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro (Meyer *et al.*, 1996). Previamente, se reportó que J1-1 presenta actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Meyer *et al.*, 1996); su sobreexpresión en plantas de *Capsicum annuum*, confiere resistencia a la enfermedad de antracnosis provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*. En el mismo trabajo, J1-1 obtenida como péptido de fusión a GST, GST-J1-1, mostró actividad inhibitoria *in vitro* sobre *C. gloeosporioides* (Seo *et al.*, 2014); mientras que la sobre expresión tejido-específica en tabaco, suprimió los síntomas de la enfermedad y el crecimiento de las hifas de *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*. Adicionalmente, el péptido recombinante GST-J1-1, inhibió el crecimiento de ambos microorganismos *in vitro* (Lee *et al.*, 2018). En nuestro grupo de trabajo, J1-1 se obtuvo de forma recombinante unida a una etiqueta de 6His (HisXarJ1-1), se unió a varios fosfolípidos incluyendo a PA y también presentó actividad antibacteriana *in vitro* sobre el patógeno de humanos y animales *Pseudomonas aeruginosa* (Guillén-Chable *et al.*, 2017).

1.6. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSINAS DE PLANTAS

Los genes de defensinas de plantas están formados por lo general por dos exones y un intrón (Rodríguez-Decuadro *et al.*, 2019; Carvalho y Gomes, 2009). El primer exón codifica al péptido señal y el segundo al péptido maduro. El intrón, suele localizarse entre los exones. Una excepción de esta organización génica es la defensina StSN₂, la cual tiene dos intrones (Carvalho y Gomes, 2009). La expresión de genes de defensinas de plantas muestra diferentes patrones, lo cual refleja diferentes funciones de los péptidos. En condiciones fisiológicas, se ha descrito la expresión de defensinas en diferentes tejidos, además también son inducidas en respuesta a estrés biótico o abiótico (Carvalho y Gomes, 2009). En plantas, las defensinas pueden ser expresadas en las semillas, tubérculos, hojas, raíces, frutos, órganos florales, corteza y en las vainas (Parisi *et al.*, 2019; Tam *et al.*, 2015).

En paralelo a la expresión de defensinas de plantas en múltiples órganos, se ha demostrado que su expresión puede regularse en respuesta a factores bióticos o abióticos específicos. Por ejemplo, se identificaron 10 genes de defensinas en tomate, su caracterización estructural confirmó el plegamiento tridimensional CSαβ característico de defensinas de plantas, se encontró también conservación de aminoácidos (principalmente glicina, cisteína y arginina). En ese trabajo se menciona que la variedad estructural de las defensinas de tomate, no correlaciona con una

regulación transcripcional diferencial, ni con su papel en la defensa de la planta, lo que permite inferir funciones selectivas o cierta especificidad. En tomate también se observó que la transcripción de la mayoría de los genes relacionados a defensinas se expresaron tras la inoculación con hongos y nemátodos. En contraste, no hubo expresión de genes de defensinas en presencia de virus, y al aplicar temperaturas bajas, se observó una ligera baja en la tasa de transcripción de genes de defensinas. Los autores mencionan, que la expresión de defensinas en plantas, depende principalmente del reconocimiento de PAMPs. *Verticillium dahliae* y *Meloidogyne javanica*, estimularon la transcripción de la mayoría de los genes de defensinas en tomate. No obstante, los virus CMV y PVY no indujeron expresión. Por lo anterior se concluyó que, el sistema de regulación de la expresión de genes de defensinas en tomate, carece de especificidad hacia virus (Nikoloudakis *et al.*, 2020).

1.7. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DEFENSINAS DE PLANTAS

Las defensinas son descritas a menudo como parte de la inmunidad innata, y por lo tanto se considera que son una superfamilia con un ancestro común. Sin embargo, se ha argumentado que no todas las defensinas evolucionaron de un solo ancestro en común, mediante un análisis filogenético se generó evidencia sobre los orígenes de las defensinas a partir de dos ancestros por estudios de similitud estructural con 2,713 secuencias o estructuras de defensinas. Dichos análisis, revelaron la existencia de dos superfamilias independientes (defensinas *cis* y *trans*, Figura 1.6), las cuales son estructural y funcionalmente cercanas (Cools *et al.*, 2017; Shafee *et al.*, 2016). Por lo tanto, la similitud entre las defensinas se atribuye a una evolución convergente.

Las diferencias entre ambas familias se observan en la orientación y conectividad de los enlaces disulfuro, la longitud de los bucles inter-cisteínas y su distribución entre los eucariotas. Las *cis*-defensinas son la familia más grande de defensinas, en ella se incluyen a las defensinas de plantas, hongos y la mayoría de defensinas de invertebrados, estructuralmente se distinguen por la hoja β C-terminal que está unida a la α -hélice por enlaces disulfuro, ambas orientadas en la misma dirección (Figura 1.6, A). Por otra parte, las *trans*-defensinas, son la familia más pequeña de defensinas e incluye a defensinas de vertebrados e invertebrados, estructuralmente se distingue por una hoja β , la cual se encuentra unida por enlaces disulfuros a una α -hélice orientada en sentido contrario (Figura 1.6, B). Los espacios inter-cisteínas (asas) son más largos y diversos en las tipo *cis*, en contraste en las tipo *trans*, son cortos y poco variables (Cools *et al.*, 2017).

Por otra parte, las defensinas de plantas están divididas en dos clases con base en a la estructura de las proteínas precursoras (Cools *et al.*, 2017). Las defensinas de clase I son la clase más grande, y se caracterizan por tener un péptido señal de exportación al retículo endoplasmático seguido por el dominio de la defensina madura (Figura 1.6, C). Las defensinas de la clase II son la clase más pequeña, estas además del péptido señal y la región madura, contienen un propéptido en el extremo C-terminal de aproximadamente 33 aminoácidos, el cual dirige al péptido hacia la vacuola, donde más tarde es removido durante el proceso de maduración (Cools *et al.*, 2017).

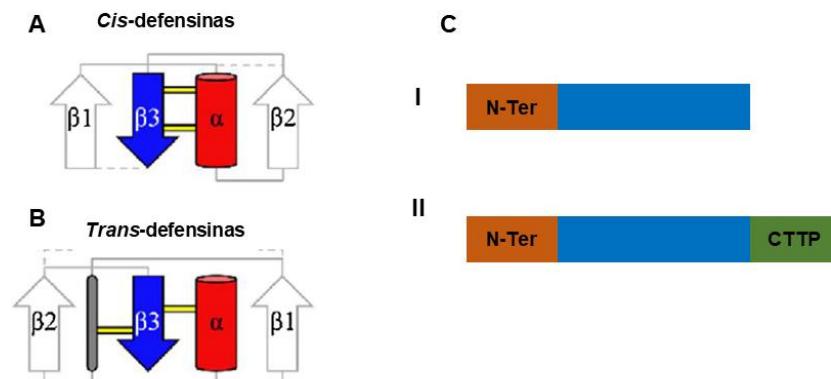


Figura 1.6. Clasificación de defensinas de acuerdo a sus características estructurales. (A), cis-defensinas; (B), trans-defensinas; (C), defensinas clase I y II. (α , alfa hélice; $\beta 1$, beta plegada 1; $\beta 2$, beta plegada 2; $\beta 3$, beta plegada 3; N-Ter, amino terminal; CTPP, propéptido C terminal. Tomado y modificado de Parisi *et al.* (2018).

Desde el punto de vista funcional, se han descrito otras clasificaciones para las defensinas de plantas. La clasificación de acuerdo a la capacidad de inhibir o no inhibir el crecimiento fúngico, así como el efecto que los péptidos ejercen sobre la morfología durante el crecimiento fúngico (defensinas morfogénicas o no morfogénicas) (Broekaert *et al.*, 1995). Entre los esfuerzos por conocer las funciones de estos péptidos a partir de su secuencia de aminoácidos, se realizó un análisis de las secuencias de 139 defensinas de plantas depositadas en la base de datos del NCBI. Mediante alineamientos y árboles filogenéticos se agrupó a las defensinas con base en su identidad de secuencia, además en análisis posteriores de los grupos, se identificó la similitud funcional entre las defensinas de cada grupo (van der Weerden y Anderson, 2013). Sin embargo, aún no es posible determinar por estos métodos la actividad antimicrobiana específica o la selectividad a fosfolípidos, siendo ambas características de un gran número de defensinas.

1.8. PATÓGENOS ESKAPE: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Importancia Epidemiológica)

La importancia de encontrar moléculas con actividad antibacteriana contra patógenos del grupo denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*) deriva del llamado de las autoridades internacionales encargadas de monitorear posibles brotes epidémicos o pandémicos. A consecuencia de la reciente pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, los programas de monitoreo mantienen un estado de preocupación constante debido a que un gran número de bacterias han generado resistencia a los medicamentos usados normalmente para su control, lo cual sin duda es un problema serio de salud pública (Idris y Nadzir, 2023). La multirresistencia a fármacos o MDR (por sus siglas en inglés, Multi-drug resistance) se define como la resistencia adquirida a uno o más agentes antimicrobianos, de tres o más categorías de antimicrobianos (Idris y Nadzir, 2023). Precisamente los microorganismos incluidos en la lista ESKAPE, se encuentran entre los patógenos que más preocupación causan en la actualidad debido a que presentan la mayor multirresistencia a antibióticos.

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (WHO) publicó una lista de patógenos para los que el desarrollo de nuevos antibióticos es urgente (Tacconelli *et al.*, 2018). Para el año 2020, no existía en el mundo una organización especializada en el monitoreo de la resistencia a antimicrobianos, aunque de acuerdo a la información disponible, se estima que hay más de 2 millones de infecciones relacionadas con la multirresistencia, de las cuales 29,000 derivan en muertes cada año tan solo en los Estados Unidos de Norteamérica, lo que en términos de dinero equivale a más de \$ 4.7 billones de dólares. La situación en Europa es de más de 33,000 muertes y 874,000 incapacidades asociadas a infecciones, costando alrededor de \$ 1.5 billones de dólares en costos directos e indirectos (De Oliveira *et al.*, 2020).

P. aeruginosa se ha reportado como una bacteria resistente a la mayoría de los antibióticos disponibles. En un trabajo realizado por Tacconelli *et al.* (2018), *P. aeruginosa* fue ubicada dentro del top 5 de bacterias con mayor prioridad para desarrollar antibióticos que permitan su control. *P. aeruginosa* es una bacteria aeróbica Gram-negativa en forma de bacilo. Este patógeno puede formar biopelículas y es responsable de un 10 a 20% de las infecciones en hospitales (Rocha *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* es la segunda bacteria con importancia clínica y epidemiológica. Es la principal causa de infecciones en hospitales entre los bacilos Gram-negativos no fermentadores y la mayor causa de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. El hecho de

que sea causa de infecciones en hospitales y en pacientes inmunocomprometidos, es debido al desarrollo de múltiples mecanismos de resistencia, formación de películas, mecanismos de degradación y transporte propio de su adaptación a diversos ambientes lo cual reduce la eficacia de los antibióticos usados para su tratamiento, además de incrementar el costo del tratamiento (Rocha *et al.*, 2019). Otra consecuencia de lo anterior, es el incremento de las tasas de mortalidad y morbilidad asociadas a este patógeno.

Por otra parte, *S. aureus* se ha reportado como resistente a meticilina. *S. aureus* es una bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva en forma de coco. Actualmente se conoce que *S. aureus* resistente a meticilina, ha desarrollado también resistencia a antibióticos como la daptomicina y la vancomicina, hecho que complica más su tratamiento (Nikolic y Mudgil, 2023). Se conoce que el 30% de la población humana es colonizada por esta bacteria. Simultáneamente, es la principal causa de bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como de infecciones osteoarticulares, de piel, de tejido blando, pleuropulmonar, y de infecciones asociadas a dispositivos de uso médico (Tong *et al.*, 2015). Al igual que *P. aeruginosa*, *S. aureus* forma parte de la lista publicada de los microorganismos ESKAPE y se encuentra también en la lista de microorganismos de mayor importancia clínica y epidemiológica (Tacconelli *et al.*, 2018). Se conoce que algunos de los mecanismos asociados a la resistencia de esta bacteria contra los agentes utilizados para su control, se basan en la inactivación o alteración de la estructura del antibiótico a través de reacciones enzimáticas, la modificación de los sitios de unión del antibiótico, activación de bombas de exclusión para la eliminación del antibiótico, y cambios en la estructura de la membrana (E.g., pérdida de porinas para evitar la entrada del antibiótico) (Idris y Nadzir, 2023).

1.9. ACTIVIDADES DESCRITAS EN DEFENSINAS DE PLANTAS

Las defensinas de plantas son los componentes principales del sistema de defensa innato (Parisi *et al.*, 2018). Estos péptidos no son tóxicos para mamíferos o células de plantas, pero sí contra hongos y bacterias patógenos de humanos y plantas. A partir del inicio del estudio de las defensinas de plantas en la década de 1990 (Terras *et al.*, 1995, 1993; Mendez *et al.*, 1990), se han identificado diversas actividades en estos péptidos (Figura 1.7), como: inhibidores de síntesis de proteínas, (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004; Ye y Ng, 2002; Mendez *et al.*, 1990), inhibidores de proteasas (de Beer y Vivier, 2011; Lin *et al.*, 2009; Mosolov y Valueva, 2008; Wong y Ng, 2006), bloqueadores de canales iónicos (Vriens *et al.*, 2016; Carvalho y Gomes, 2007; Spelbrink *et al.*, 2004; Kushmerick *et al.*, 1998), factores de tolerancia a metales pesados (Mirouze *et al.*, 2006), como anticancerígenos (Baxter *et al.*, 2015; Poon *et al.*, 2014; Weerden *et*

al., 2010; Lin *et al.*, 2009), como antivirales (Ishaq *et al.*, 2019; Salas *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2009; Ye y Ng, 2002), factores del desarrollo de plantas (Lay *et al.*, 2012; Amien *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2008; Letousey *et al.*, 2007), como inhibidores de enzimas (Pelegri *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2002) y como antibacterianos (da Silva Gebara *et al.*, 2020; Sathoff *et al.*, 2019, 2020; Guillén-Chable *et al.*, 2017).

No obstante, la actividad antifúngica ha sido la mejor caracterizada (Ochiai *et al.*, 2020; Pacheco-Cano *et al.*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2017; Vriens *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2015; Solis *et al.*, 2007; Wisniewski *et al.*, 2003), por lo tanto no es una sorpresa que la mayoría de los mecanismos de acción descritos de estos péptidos se hayan elucidado para defensas antifúngicas.

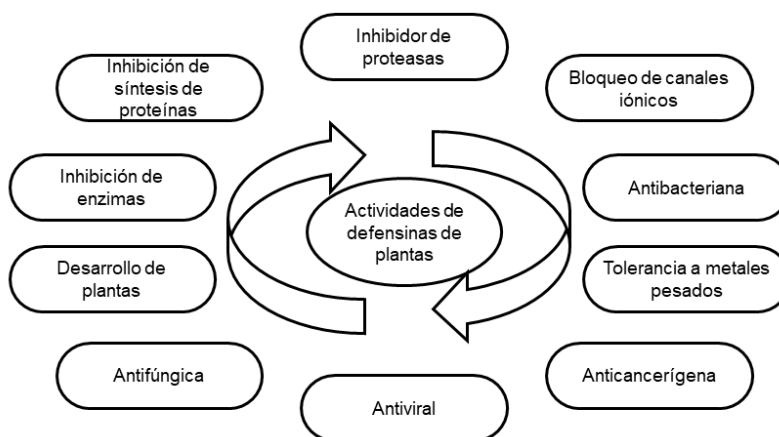


Figura 1.7. Múltiples actividades de las defensas de plantas.

1.10. RESPUESTA AL EFECTO ANTIMICROBIANO GENERADO POR DEFENSINAS DE PLANTAS EN PATÓGENOS

En paralelo a los estudios orientados a la caracterización de los mecanismos de acción, recientemente se han observado los múltiples efectos que estos péptidos generan sobre la célula blanco desde enfoques proteómicos o genéticos.

En un estudio reciente, se analizó el proteoma de *Escherichia coli* en respuesta a concentraciones sub-inhedorias (37 μ M) del péptido sintético derivado de la defensina Atr-DEF2, (G39-C54, del γ -core) (Moyer *et al.*, 2021). En dicho estudio se identificaron un total de 1598 proteínas de las cuales 82 mostraron abundancia alta y 51 a la baja respecto al control. Las proteínas con mayor abundancia sugieren que *E. coli* responde al tratamiento a través de la

expresión de proteínas involucradas en procesos de deficiencia de hierro o en la disrupción de la membrana externa, a través de un mecanismo de adaptación común en bacterias Gram-negativas en respuesta a antibióticos con actividad lítica sobre la membrana.

En bacterias, un mecanismo de resistencia consiste en disminuir la atracción electrostática entre el lípido A y los péptidos antimicrobianos catiónicos. Una de las vías para la reducción de cargas es a través de la adición de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) a la cabeza fosfolipídica del lípido A, inhibiendo así la atracción electrostática de péptidos antimicrobianos catiónicos. En el análisis, se observó un incremento de seis proteínas de la vía de modificación del lípido A con arabinosa, por lo que el resultado sugiere que existe una ruta de señalización para responder al estrés generado en la membrana externa de *E. coli*. Además, la proteína bifuncional ArnA de resistencia a polimixina, ArnC y probable ArnD que forman parte del clúster de genes *arn* y que catalizan la biosíntesis de L-Ara4N también incrementaron, lo cual indica que *E. coli* responde enmascarando la carga negativa de la membrana externa con L-Ara4N para evitar la lisis de la membrana a causa del péptido sintético Atr-DEF2 (G39-G54). Para profundizar más en el efecto del péptido sobre la membrana, se utilizó un ensayo de fijación de NPC (1-N-fenilnaptilamina), y se determinó que a concentraciones subletales de 37 μM de Atr-DEF2 (G39-G54) se perturba la integridad de la membrana externa. Además, se observó que el tratamiento con el péptido generó una posible deficiencia en la disponibilidad del hierro en *E. coli*, pues se observó actividad reductora y quelante de Atr-DEF2 (G39-G54) sobre Fe^{3+} y Fe^{2+} respectivamente, además del perfil proteómico observado en el incremento de proteínas que participan en el metabolismo del Fe. Se conoce que la formación del complejo Fe-S, es esencial (e.g. respiración y reparación del ADN), en *E. coli* el complejo puede ser ensamblado a través de la vía del clúster hierro-azufre (ISC, iron-sulfur cluster) o por la vía de formación de azufre (SUF, sulfur formation).

También se observó un incremento en la abundancia de proteínas que participan en la vía SUF, lo cual sugiere que la célula ajusta el proceso de ensamblaje Fe-S debido a un ambiente limitado de hierro, mientras que 14 proteínas que utilizan el clúster Fe-S como cofactor bajaron en abundancia indicando baja disponibilidad del cofactor. De las 14 proteínas, 11 están asociadas con el término “generación de precursores metabólicos y energía” lo cual sugiere que la limitación de Fe provoca cambios en el metabolismo energético. Adicionalmente, se observó el incremento en abundancia de proteínas, que participan en la síntesis de sideróforos (e.g. enterobactina y aerobactina). Los sideróforos son metabolitos secundarios que unen e importan Fe^{3+} extracelular, de este modo, puede ser posteriormente incorporados a las biomoléculas.

1.11. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PRINCIPALES LIGANDOS LIPÍDICOS Y SU RELACIÓN CON LAS DEFENSINAS

Las defensinas de plantas son capaces de unirse a esfingolípidos o fosfolípidos (Cools *et al.*, 2017). Ambos tipos de moléculas, de naturaleza anfipática constituyen los principales componentes de las membranas celulares, y por lo tanto son importantes lípidos estructurales (Pan *et al.*, 2018). Los esfingolípidos, son lípidos de membrana eucariota que consisten de un esqueleto de ceramida junto con una cabeza polar, de acuerdo con la estructura de la cabeza polar, los esfingolípidos pueden dividirse más allá en fosfoesfingolípidos y glucoesfingolípidos (Cools *et al.*, 2017). Los fosfolípidos, son los componentes mayoritarios de la membrana eucariota, y consisten de un esqueleto de glicerol unido a dos ácidos grasos y una cabeza polar. Esta diferencia podría definir diferentes mecanismos de acción sobre las células blanco (Francisco y Georgina, 2017). Dependiendo de la cabeza polar, se conocen varias especies de fosfolípidos (Cools *et al.*, 2017). Un grupo de fosfolípidos, los fosfoinositidos que comprenden un grupo de siete derivados fosforilados del fosfatidil inositol (PI): PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ (Phan *et al.*, 2019), son interconvertibles espaciotemporalmente por cinasas y fosfatasaes específicas. A pesar de su baja abundancia, son reguladores de procesos celulares tales como: transducción de señales, crecimiento celular y sobrevivencia, muerte celular, remodelamiento del citoesqueleto, tráfico de membrana, docking molecular y reclutamiento de membranas (Loewith *et al.*, 2019; Phan *et al.*, 2019). Es interesante que, los microorganismos patógenos y las células tumorales tienen la capacidad de evadir los sistemas inmunes y de control de ciclo celular para promover su ciclo de vida o crecimiento respectivamente (Phan *et al.*, 2019). Existe evidencia que demuestra que los fosfoinositidos y las enzimas que los modifican, son manipulados por patógenos y por las células tumorales, logrando así su sobrevivencia (Phan *et al.*, 2019).

La actividad antimicrobiana relacionada a la unión con fosfolípidos se postuló en 1942, cuando se observó que el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei* fue inhibido por una proteína conocida como purotionina (Woolley y Krampitz, 1942). Debido a la naturaleza catiónica de las defensinas, una de sus propiedades más observadas es la del reconocimiento y unión a lípidos. Por lo tanto, son péptidos que se unen a la membrana celular, propiedad considerada como uno de los principales pasos en sus mecanismos de acción, aunque se ha observado que hay algunas que tienen la capacidad de ingresar a la célula. Ambas actividades, correlacionan con su actividad biológica, tal como se ha observado en defensinas

de mamíferos y de plantas como: HBD3, HBD2, MtDef4, MsDef1, NaD1, NoD173, NsD7 y TPP3 (Lay *et al.*, 2019; Järvå *et al.*, 2018; Kvensakul *et al.*, 2016; Phan *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2015; Poon *et al.*, 2014; Sagaram *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se observó que los péptidos reconocieron al PA, y en particular, uno de los péptidos reconoció a fosfatidilserina (PS). PA es el fosfolípido más sencillo y el principal intermediario en la síntesis de los lípidos de membrana y de reserva. Su estructura consta de un esqueleto de glicerol a la que se unen dos cadenas de ácidos grasos y una molécula de ácido fosfórico con carga negativa (Figura 1.8 B). Entre sus actividades celulares, se encuentran su función como segundo mensajero en la determinación del destino celular, interacción de organelos, transducción de señales y otros procesos fisiológicos (Zhou *et al.*, 2023). Por otra parte, la PS es un fosfolípido cargado negativamente, estructuralmente similar al PA con la diferencia que al ácido fosfórico se une el amino ácido serina (Figura 1.8 A) (Cassilly y Reynolds, 2018). La PS se localiza en las membranas celulares, donde en condiciones homeostáticas normales se encuentra restringido a la membrana interna de bicapa lipídica. La participación de PS se ha observado en estadios apoptóticos celulares, mimetismo protista (una condición donde ciertos patógenos exponen en su superficie celular PS para poder ingresar a la célula, y allí desplegar su virulencia) y en algunos tipos de cáncer, donde la externalización de PS tiene lugar (Calianese y Birge, 2020).

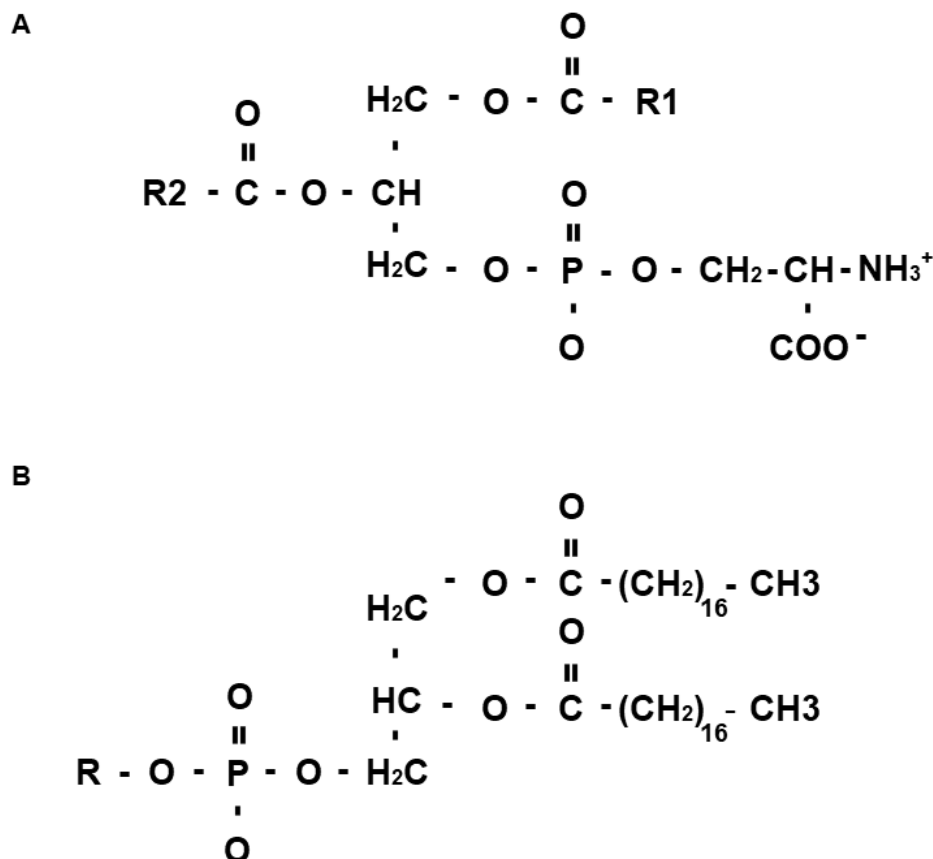


Figura 1.8. Estructuras de fosfolípidos. A) Fosfatidilserina (PS); B) Ácido fosfatídico (PA).

1.12. DETERMINANTES ESTRUCTURALES PARA EL RECONOCIMIENTO DE LÍPIDOS

Derivado del estudio de los mecanismos de acción de las defensinas y del análisis de sus complejos estructurales obtenidos por cristalografía de rayos X, se ha observado que la formación de dímeros es una característica importante para la actividad de muchas defensinas clase II. Dicho fenómeno parece ser el inicio de un mecanismo más complejo, pues se conoce que dichas defensinas forman estructuras oligoméricas de manera dependiente de la concentración de lípidos. En los análisis de estructura-función, se han identificado los residuos de aminoácidos que participan en la dimerización y la oligomerización dependiente de lípidos, residuos que además, al mutarlos, inducen efectos negativos en la actividad biológica (Ochiai *et al.*, 2020; Kvansakul *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2015).

Dado que los lípidos parecen ser los blancos o ligandos principales de las defensinas de plantas, no está de más mencionar que dichas moléculas forman la base estructural de las membranas de todas las células, incluyendo también la de las bacterias multirresistentes a antibióticos. Se

conoce que los perfiles de lípidos que componen a la membrana de estos microorganismos pueden condicionar la efectividad de los antibióticos y de las proteínas que se encargan de expulsar los antibióticos (Carey *et al.*, 2022). Además de otros mecanismos que ya se mencionaron previamente.

1.12.1. El γ -core

El γ -core es el motivo estructural más estudiado en defensinas de plantas. Este comprende las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ y el asa que las conecta. Se ha caracterizado como una región conservada en péptidos antimicrobianos de diferentes reinos, es además determinante en la actividad antimicrobiana.

En uno de los primeros estudios orientados a conocer el rol del γ -core en la actividad antifúngica en defensinas de *Medicago*, se obtuvo la quimera MsDef1- $\gamma 4$ (γ -core de MtDef4 fue introducido en el lugar del γ -core de MsDef1). Se observó que esta mutante no conservó la capacidad de permear la membrana comparada con MtDef4 WT, pero sí mejoró su actividad en *Fusarium graminearum*. Además, se describió que las argininas concentradas en el motivo GXCX₃₋₉C (RGFRRR), son determinantes de la unión a micelas artificiales en una manera dependiente de PA, mediante una mutante de MtDef4, se determinó que las argininas determinan la capacidad de permear la membrana en *F. graminearum*. La variante MtDef4 (AAAARR) se une específicamente a PA, pero perdió la capacidad de internalizarse a través de la membrana, además de que su actividad antifúngica disminuyó. Por lo tanto, los resultados de dicho estudio sustentan que la región que conecta a las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ es determinante estructural de la selectividad a lípidos y también de la actividad antifúngica en MtDef4 (Sagaram *et al.*, 2011, 2013). Sin embargo, considerando la información disponible, aún no es posible diseñar defensinas de plantas con selectividad o actividad definida *a priori*.

1.12.2. Actividad antimicrobiana del γ -core

Recientemente se han caracterizado distintos péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana basados en el γ -core. Las comparaciones en la actividad entre las defensinas como péptido maduro y los péptidos cortos basados en el γ -core, indican que los péptidos presentan de un 10 a un 40% de la actividad observada en una defensina "completa". Algunos reportes de actividad antimicrobiana para péptidos derivados del γ -core, se mencionan a continuación:

Kaewklom *et al.* (2018) reportaron que el péptido BcDef1, indujo niveles altos de despolarización de membrana derivado de su capacidad para permeabilizar. Los resultados sugieren que BcDef1 altera el potencial de membrana, así como la permeabilización de células de *Staphylococcus epidermidis* en una manera dependiente de tiempo. BcDeF1 afecta la morfología de la célula. Las células no tratadas mostraron una forma celular normal y tuvieron una pared celular y membrana celular sin daño en la membrana externa o interna. En contraste, células tratadas con el péptido con 0.5xMIC de BcDeF1 por dos horas mostraron daño en las estructuras de las células y cambio dramático en la pared y membrana celular. BcDef1 generó alteraciones estructurales, incluyendo la formación de burbujas en la membrana, numerosas estructuras parecidas a mesosomas, cambios en el grosor de la pared celular, formación de poros en la pared y membrana celular, disrupción de la membrana y pared celular, y liberación de contenido celular.

De acuerdo a Sathoff *et al.* (2019) bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, han desarrollado la habilidad de modificar la superficie de las membranas en respuesta a las interacciones electrostáticas con los AMPs catiónicos.. En *P. aeruginosa* y muchas otras bacterias Gram-negativas, el sistema PhoP/PhoQ o PmrA/PmrB controla varios de los genes requeridos para resistencia a AMPs. Modificaciones realizadas en la membrana, protegen a las bacterias de los AMPs catiónicos a través de cubrir/enmascarar las cargas negativas de la superficie, lo cual limita la unión de los AMPs a las membranas bacterianas.

En el estudio realizado por Sathoff *et al.* (2019), se investigó el modo de acción de péptidos basados en el γ -core (defensinas truncadas de 10 a 20 péptidos aproximadamente) de varias defensinas de plantas (MtDef4, MtDef5A y So-D2) en bacterias patógenas de plantas (*P. syringae*) y de vertebrados (*P. aeruginosa*) del género *Pseudomonas*. Cepas de *P. aeruginosa* lux-reporter con mutaciones en los genes estructurales de PA3553 y PA4774 (adición de aminoarabinosa al lípido A y responsable de la síntesis de espermidina respectivamente) involucrados en mecanismos de resistencia a AMPs catiónicos, fueron analizados en respuesta al tratamiento con los péptidos derivados del γ -core de defensinas de plantas. Usando el reportero lux bajo el control transcripcional de los promotores de los genes PA3553 y PA4774, se observó que MtDef4 induce la expresión de ambos genes asociados a la resistencia, indicando que MtDef4 probablemente actúa en la membrana externa de *P. aeruginosa*, actividad que se confirmó a través del uso de microscopía de fluorescencia. En ese mismo estudio, se generaron bibliotecas de inserción de transposones en *P. syringae* pv. *syringae*, las cuales se escrudiñaron para observar resistencia a los péptidos usados en el tratamiento. Se identificaron mutantes

resistentes por secuenciación, así como los sitios de inserción de los transposones. Se observó que los genes interrumpidos, los cuales se anotaron como genes rRNA 16S y 23S, están involucrados en la resistencia a defensinas de plantas. Esto sugiere que MtDef4 puede funcionar como inhibidor de la síntesis de proteínas.

En otro estudio, Toledo *et al.* (2021) sintetizaron péptidos de 15 aminoácidos basados en la defensina VuDef (*Vigna unguiculata*) con actividad antifúngica mejorada contra levaduras. El objetivo fue comprobar la hipótesis acerca de la correlación que existe entre la estructura primaria y la actividad biológica de las defensinas de plantas, pero enfocándose a propiedades específicas como la carga, hidrofobicidad y quiralidad. El diseño de los péptidos se realizó mediante un análisis de la estructura primaria del γ -core para determinar cuáles aminoácidos participan en la actividad antimicrobiana. Los autores diseñaron tres nuevos péptidos denominados: VuDef (RR), VuDef (D-RR) y VuDef (WR), los valores correspondientes a carga total de los péptidos fueron de +6, +6 y +6, y de hidrofobicidad 18.32, 18.32 y 14.10 Kcal/mol respectivamente, mientras que el péptido silvestre (VuDef DD), tiene una carga de +2 y una hidrofobicidad de 21.98 Kcal/mol. De acuerdo a los autores, el incremento en la carga neta positiva (de +2 a +6) e hidrofobicidad (de 21.98 a 14.1 Kcal/mol) confirieron al péptido VuDef WR la mejor actividad antifúngica, en contraste con el resto de los péptidos. Se determinó que los péptidos utilizados en el estudio, tienen mayor actividad antifúngica que el fluconazol, además de que se observó que los péptidos muestran muy baja citotoxicidad en células de mamíferos (RAW 264.7 o THP-1) en concentraciones LD₁₀₀ determinadas previamente para hongos de importancia médica. De acuerdo a los autores, existen dos puntos clave a considerar en la correlación estructura-función: 1) la correlación entre la longitud y la actividad antimicrobiana y 2) la correlación carga-hidrofobicidad.

Recientemente Slezina *et al.* (2021) describieron la actividad antimicrobiana de péptidos derivados del γ -core de distintos péptidos antimicrobianos de plantas de tomate como por ejemplo: DEFLs o péptidos defensin-like, snakinas, nsLTPs o proteínas de transferencia de lípidos no específicas y péptidos MEG o genes expresados maternalmente. Los péptidos se probaron sobre hongos y bacterias patógenos de humanos y plantas. Los dos péptidos con mayor actividad antimicrobiana fueron seleccionados (_{v58-74}SIDEFL y _{v89-106}SISN9, DEFL o snakinas, respectivamente) para elucidar un putativo mecanismo de acción. A través de microscopia de fluorescencia y con el uso de yoduro de propidio, se observó la presencia de yoduro de propidio al interior de células de *Candida albicans*, por lo que la permeabilización de la membrana se propuso como parte del mecanismo de acción utilizado por ambos péptidos.

Ambos péptidos contienen la firma RGFRRR, la cual previamente ha sido descrita como determinante clave en la translocación de MtDef4 al interior de células de *F. graminearum*. Finalmente, la correlación entre actividad antimicrobiana alta y mayor carga positiva fue observada en los péptidos estudiados.

1.12.3. Determinantes estructurales en defensas de plantas

Varios trabajos han descrito a nivel molecular, la relación estructura-función de defensas de plantas (Lay *et al.*, 2019; Järvå *et al.*, 2017, 2018; Islam *et al.*, 2017; Bleackley *et al.*, 2016; Kvansakul *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2015; Poon *et al.*, 2014). Estos análisis, han permitido conocer más acerca de los putativos modos de acción de las defensas, interfaces de interacción péptido-péptido o lípido-péptido, selectividad hacia fosfolípidos y de manera muy importante, han llevado la identificación de residuos aminoacídicos que resultan imprescindibles para el efecto de las defensas de plantas sobre células eucariotas y procariotas (Velivelli *et al.*, 2018; Sagaram *et al.*, 2011, 2013).

De acuerdo a Parisi *et al.* (2018) y Francisco y Georgina, (2017), existen otros aminoácidos conservados: glicina en las posiciones 12 y 32, los aromáticos en la posición 10, glutamato en la posición 27, además de residuos variantes de K o E en la posición 4; K, H, D, Y y N en la posición 33 y F o L en la posición 42. Durante la última década, una serie de trabajos han descrito la existencia de determinantes estructurales importantes para la interacción con lípidos y para su actividad antimicrobiana en diversas defensas de plantas.

Poon *et al.* (2014), describieron determinantes estructurales en la interacción NaD1-PIP₂, donde dos interfaces fueron descritas en la interacción del dímero NaD1-NaD1 en la cristalización de NaD1-PI (4,5) P₂. La primera interfaz se presenta por un alineamiento antiparalelo de la hoja β1 de cada monómero (monómeros I y II), formada por una red de seis puentes de hidrógeno involucrando a R1, K4, E6, E27, K45 y C47. La segunda interfaz consiste del dímero NaD1 y los monómeros adyacentes III y IV, formada por puentes de hidrógeno involucrando a N8 del monómero I, R1, E2 y K17; D31 del monómero II, R1 y K17; D31 del monómero III y N8 del monómero IV. En dicho trabajo se observó que las interacciones entre los dímeros se repiten siete veces para permitir el 14-mero formado con 14 moléculas de PIP₂ en forma de arco, el cual tiene un radio externo de 90 angstroms (Figura 1.9). Además, se caracterizó el efecto de mutaciones en el reconocimiento a fosfolípidos de NaD1 recombinante y de un par de mutantes, y se observó un cambio en el perfil de unión a lípidos en ambas mutantes respecto a NaD1 WT

(Figura 1.9), dichas mutantes redujeron también su actividad antimicrobiana en contra de *Fusarium oxysporum*.

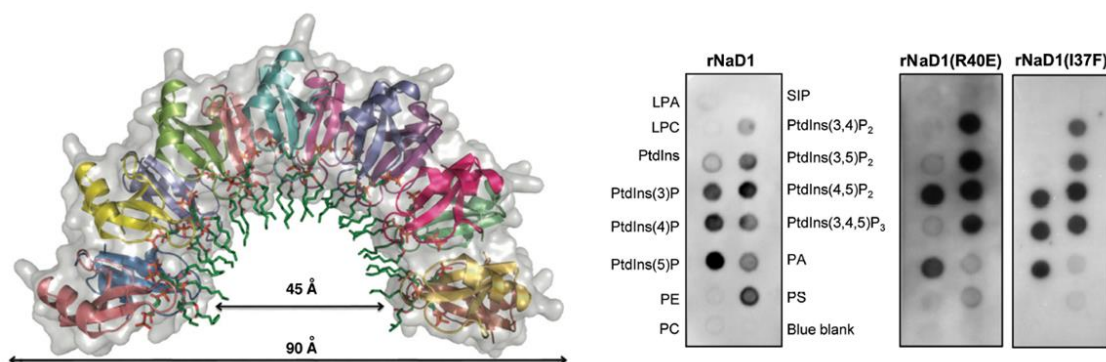


Figura 1.9. Estructura tridimensional del complejo NaD1-PI (4,5) P₂ y perfil de unión a lípidos de NaD1 y mutantes *in vitro*. Tomado y modificado de Poon *et al.* (2014).

Kvansakul *et al.* (2016), caracterizaron el complejo formado por tres dímeros de Nsd7 y seis moléculas de PA. Dicho complejo, mostró que el interior del complejo lípido-proteína forma una doble hélice que se alinea a través de una serie de isoleucinas (I15 e I37) que se intercalan en forma de zipper. Dos sitios de unión a PA, se describieron: Sitio I, donde los residuos K36 y R39 de dos monómeros Nsd7 adyacentes (de diferentes dímeros) forman interacciones iónicas con el fosfato del PA. Además, K36 y R39 de un monómero forman puentes de hidrógeno con el grupo carbonilo de I15 y K36 respectivamente; el sitio II, una segunda molécula de PA al grip catiónico formado por cada dímero Nsd7. En este sitio, K4 y H33 de una cadena sencilla forma interacciones iónicas con el fosfato de PA. K4, también forma un puente de hidrógeno con un grupo carbonilo en la cadena acilo de PA.

Järva *et al.* (2017), resolvieron la estructura cristalográfica del complejo Nsd7-PIP₂. En dicha estructura Nsd7 se encuentra en una configuración formada por seis dímeros Nsd7 y 12 moléculas de PIP₂. Cada dímero está ensamblado vía disposición antiparalela de las láminas β plegadas en el extremo N-terminal de dos monómeros, así como también por puentes de hidrógeno entre K45 y el grupo carboxilo de la C47, y por puentes salinos entre R5 y la estructura acilo de K1. Las interacciones dímero-dímero comprenden seis puentes de hidrógeno: E6-K17, N8-D31 y A0-D2. Los dos sitios de unión a PI (4,5) P₂ en cada dímero son idénticos, donde

ambos monómeros están involucrados en la unión a PI (4,5) P₂ vía K4 y los residuos 33-40 (los cuales son parte del γ -core KILRR en el asa entre las láminas β 2 y β 3).

Järva *et al.* (2018), observaron que PA tiene contacto con los residuos S35, I37, L38 y R40 de un dímero de NaD1. Los aminoácidos K36 y R39 de los dímeros adyacentes forman puentes de hidrógeno con el fosfato a través de 3 moléculas de agua que se conservan en los 14 sitios de unión a PA, a este complejo se le denominó MDC (complejo de disrupción de membrana). La formación del complejo NaD1-PA, muestra a R39 como mediador clave de las interacciones dímero-dímero y PA. Dentro del complejo de disrupción de membrana, se identificaron un total de 7 interfaces dímero-dímero, dichas interfaces se describen en dos tipos A y B. La interface A, consiste en las interacciones por unión cooperativa con PA y un puente de hidrógeno entre E6 de un dímero y el esqueleto de K17 de un dímero adyacente. En el tipo B, los dos tetrameros en el arco central, se asocian a través de una red de puentes de hidrógeno que involucra a los residuos E6-K17 y R40 con los esqueletos de C34 y S35. Además, el ensamble del complejo de disrupción de membrana, se asocia mediante interacciones hidrofóbicas donde I13 y I15 forman interfaces hidrofóbicas continuas. La configuración de residuos de isoleucina permite en efecto, la formación de estructuras tipo cremallera (zipper) de leucina manteniendo el MDC unido y estable.

1.13. DEFENSINAS DE PLANTAS COMO ANTICANCERÍGENOS Y ANTIBACTERIANOS

Se estima que hasta el 2020 (Carratalá *et al.*, 2020), se habían identificado o diseñado más de 5000 péptidos antimicrobianos (naturales y sintéticos), lo cual contrasta con los ocho AMPs aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) (Tabla 1.1) hasta el 2020. Entre los péptidos aprobados, tres son lipoglicopéptidos derivados de la Vancomicina (Telavancina, Oritavancina y Dalbavancina), para un total de 11.

Tabla 1.1. Péptidos antimicrobianos aprobados por la FDA. Modificado de Carratalá *et al.* (2020).

Nombre	Año de aprobación	Nombre de producto	Aplicación	Microorganismos
Colistina	1962	Coly-Micins	Infección bacteriana	Bacterias Gram-negativas
Polimixina B	1964	Poly-Rx	Infección bacteriana	Bacterias Gram-negativas
Vancomicina	1983	Vancocin	Infección bacteriana	Bacterias Gram-positivas
Gramicidina D	1995	Neosporin	Conjuntivitis	Bacterias Gram-positivas
Bacitracina	1997	Baciim	Infección en piel y ojos	Bacterias Gram-positivas
Daptomicina	2003	Cubicin	Infección en piel por bacterias	Bacterias Gram-positivas
Enfuvirtide	2003	Fuzeon	Infección HIV-1	Virus
Telavancina	2009	Vibativ	Infecciones de la piel agudas por bacterias	Bacterias Gram-positivas
Telaprevir	2011	Incivo	Hepatitis C	Virus
Oritavancina	2014	Orbactiv	Infecciones de la piel agudas por bacterias	Bacterias Gram-positivas
Dalbavancina	2014	Dalvance	Infecciones de la piel agudas por bacterias	Bacterias Gram-positivas

Adicionalmente a los datos anteriores, (Moretta *et al.*, 2021) enlistan una serie de AMPs de diferentes orígenes (bacterias, hongos, plantas, insectos, animales y humanos) que se encuentran entre los ensayos preclínicos y algunos en fase clínica. Erdem Büyükkiraz y Kesmen, (2022) por su parte describen una lista de 27 péptidos antimicrobianos que se encontraban hasta en aquel momento en ensayos clínicos (entre fase I y III).

Con respecto a defensinas, recientemente hay un número limitado en ensayos clínicos (Tabla 1.2) y otras en ensayos preclínicos de desarrollo. En el caso específico de defensinas de plantas, solo figura el Pezadefotide que se encuentra en fase de prueba para su aplicación clínica. De acuerdo a Hein *et al.* (2022) las principales restricciones que impiden la aplicación de las defensinas como agentes terapéuticos son: los costos de producción altos, problemas con la formulación y método de aplicación. Adicionalmente, existen otras consideraciones como la estabilidad de los péptidos, biodisponibilidad y dirección específica del blanco en sistemas biológicos (e.g., células). No obstante, de acuerdo a Hein y colaboradores (2022), probablemente un mayor número de defensinas entren en breve a la fase de ensayos clínicos. Solo por mencionar un ejemplo, la defensina Plectasina derivada del hongo *Pseudoplectania nigrella* que ha sido utilizada en ensayos preclínicos para el tratamiento de infecciones generadas por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección en murinos, ha

mostrado resultados promisorios que posicionan a esta defensina como un candidato a agente terapéutico.

Tabla 1.2. Defensinas en desarrollo para aplicaciones clínicas. Modificado de Hein *et al.* (2022).

Producto	Defensina	Aplicación	Fase	Compañía
Pezadeftide	Defensina de planta	Infección por hongos en uñas	Fase IIa (completa) Fase IIb (en marcha)	Hexima Limited
Brilacidina	Derivado sintético de defensina	Mucositis Infección en piel Infección por COVID-19	Fase 2 completa/ Fase 2 completa, 3 planeada/ Fase 2 completa	Innovation Pharmaceuticals Inc./Innovation Pharmaceuticals Inc./Innovation Pharmaceuticals Inc.
Plectasina	Defensina de hongo	Infecciones causadas por Gram-positivas	Fase preclínica	Novozymes

Varias defensinas de plantas han mostrado actividad sobre una amplia variedad de líneas celulares tumorales *in vitro* por ejemplo, la defensina NaD1 sobre células de HCT-116 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama), MM170 (melanoma) y HeLa (cáncer cervical); defensina TPP3 sobre células U937 (linfoma monocítico humano); defensina PaDef sobre células MCF-7 y células K562 (leucemia mieloide); y Pvd1 sobre células de cáncer de cerebro HBMEC y cáncer de mama MDA-MB-231; aunque la evidencia es limitada, la tendencia es hacia encontrar nuevas defensinas con esta actividad, en lugar de intentar caracterizar los mecanismos de acción anticancerígenos de las ya previamente evaluadas (Hein *et al.*, 2022). En ese sentido, la defensina NoD173 de *Nicotiana occidentalis* ha demostrado actividad *in vivo* inhibiendo el crecimiento de melanomas B16-F1 establecidos en un modelo de ratón C57BL/6, comparado con el control (amortiguador de resuspensión del péptido) y una forma inactiva del péptido (reducido y alquilado) (Lay *et al.*, 2019).

Las defensinas tienen el potencial de ser utilizadas como agentes antimicrobianos y anticancerígenos, no obstante, se requiere profundizar en los análisis de los mecanismos de acción, y resolver conceptos como la biodisponibilidad, farmacocinética, estabilidad del péptido, ensayos de dosis, etc.

JUSTIFICACIÓN

Entre las actividades más interesantes de las defensinas de plantas se encuentran: la actividad antibacteriana y la antifúngica, y aunque su potencial para uso en el tratamiento de hongos o bacterias patógenas de humanos, animales y plantas es viable, la falta de conocimiento de sus mecanismos de acción, evita en gran medida su posible transición de ensayos *in vitro* a ensayos clínicos.

Los ensayos de estructura-función, no solo ayudan en la identificación de determinantes estructurales con principal participación en la unión a ligandos lipídicos y en la actividad antimicrobiana, sino que además generan información para mejorar el diseño de los péptidos y para estudiar sus mecanismos de acción.

En este trabajo, se diseñó un grupo de mutantes derivadas de J1-1 con base en información estructural disponible de defensinas de Solanáceas. Estos análisis de estructura-función, nos permiten evaluar como la variación de aminoácidos influye en la actividad antibacteriana, la oligomerización y el reconocimiento a fosfolípidos. Por lo tanto, se espera que los péptidos recombinantes mutantes de J1-1 diseñados, presenten cambios inducidos por las variaciones en su composición de aminoácidos, cambiando sus perfiles de reconocimiento a lípido, sus perfiles de oligomerización y su actividad antibacteriana. Los resultados, permitirán establecer una correlación entre las determinantes y su función en J1-1, además de generar información nueva para el diseño racional de otras mutantes.

HIPÓTESIS

Existen determinantes estructurales de la selectividad a fosfolípidos y de la actividad antibacteriana fuera del loop definido como γ -core, en la defensina J1-1 y que afectan su actividad sobre *P. aeruginosa*.

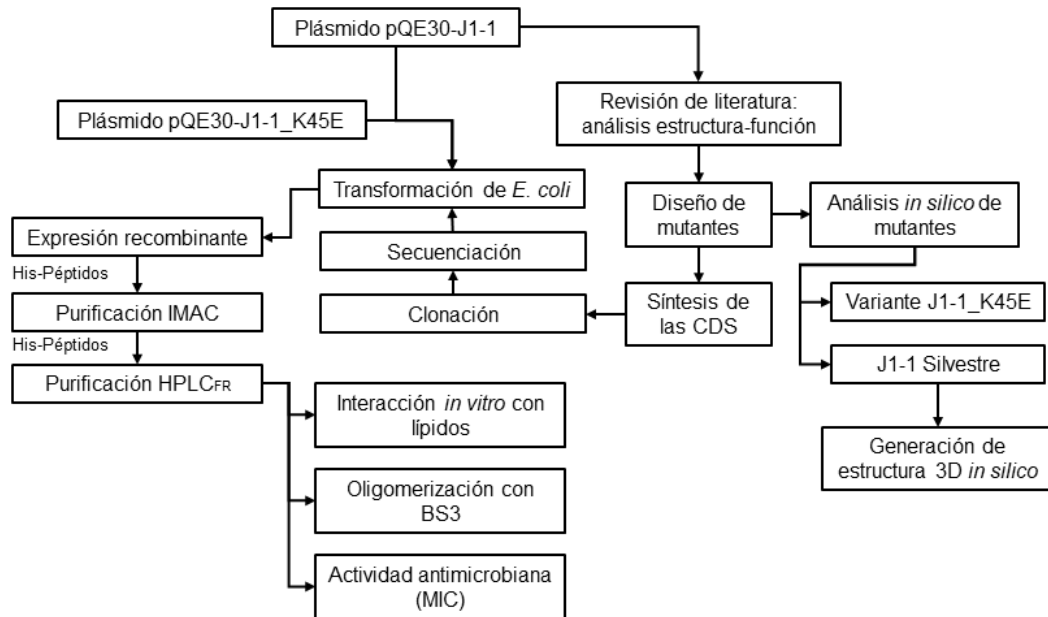
OBJETIVO GENERAL

Identificar determinantes estructurales de la selectividad a fosfolípidos y de la actividad antibacteriana de la defensina J1-1 de *Capsicum chinense*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y diseñar *in silico* las secuencias codificantes de las mutantes de J1-1 con base en datos estructurales derivados de cristalografía de rayos X de complejos defensina-lípido.
2. Obtener de forma recombinante a las variantes de J1-1.
3. Determinar el perfil de unión a fosfolípidos de las variantes de J1-1.
4. Evaluar el perfil de oligomerización de las variantes de J1-1.
5. Evaluar la actividad antibacteriana de las variantes de J1-1 sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Vectores de expresión

La secuencia codificante o CDS (por sus siglas en inglés, coding sequence) de la defensina recombinante J1-1 de *Capsicum chinense* fue previamente clonada en el vector denominado pQE30XarJ1-1, y expresada en bacterias *Escherichia coli* Origami (Guillén-Chable *et al.*, 2017). El vector de expresión pQE30 (QIAGEN) tiene 3461 pares de bases, un promotor T5 inducible con IPTG, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia que codifica para una etiqueta de histidinas y un sitio múltiple de clonación para la inserción del ADN de interés. En este trabajo, se utilizaron los sitios *Bam* *HI* y *Pst* *I*. Adicionalmente, el vector cuenta con codones en *cis* continuo al sitio múltiple de clonación para la terminación de la traducción, y un gen de selección para ampicilina.

2.1.2. Diseño de mutantes

El diseño de mutantes en este trabajo se basó en el análisis de estudios de estructura-función de defensinas de solanáceas (Järvå *et al.*, 2017, 2018; Kvensakul *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2014) de las cuales se cuenta con estructuras cristalizadas en complejo con lípidos (PDB: 6B55, 5VYP, 5KK4 y 4CQK). En los complejos, se describen determinantes estructurales que participan en la unión a lípidos y en la estabilidad del dímero y oligómero, por lo tanto, son importantes para la actividad antimicrobiana de los péptidos.

En la figura 2.1 se observa un dímero del complejo NaD1-PIP₂ (complejo formado por 7 dímeros de NaD1 y 14 moléculas de PIP₂), lo que representa un ejemplo del tipo de análisis estructural que se realizó en este trabajo para la elección de los residuos que se mutaron para la obtención de los péptidos mutantes de J1-1. La mutante J1-1_K45E se diseñó para conocer el papel del residuo catiónico en el C terminal de J1-1, la lisina 45 se observó previamente por participar en la formación y en la estabilidad del dímero, así como en la coordinación de un ion de fosfato en la interface del dímero OsAFP1 (Ochiai *et al.*, 2020; Järvå *et al.*, 2017; Poon *et al.*, 2014). La mutante J1-1_KTE está basada en la importancia de estos tres residuos del N terminal en la estabilidad del dímero, en la formación del oligómero y en el contacto directo observado con moléculas de PA y PIP₂ (Järvå *et al.*, 2017, 2018; Kvensakul *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2014). Por

último, para J1-1_DEF4, se mutaron tres residuos del γ -core, lo que derivó en un motivo catiónico (RGFRRR), el cual ha sido observado previamente en MtDef4 por ser una determinante para la actividad antifúngica y la translocación del péptido al citosol de *Fusarium graminearum* (Sagaram *et al.*, 2013). Además, residuos catiónicos en el γ -core de defensinas de solanáceas se han observado por participar en la coordinación de moléculas de PA o PIP₂, y por contribuir a la actividad antifúngica (Järvå *et al.*, 2017; Poon *et al.*, 2014).

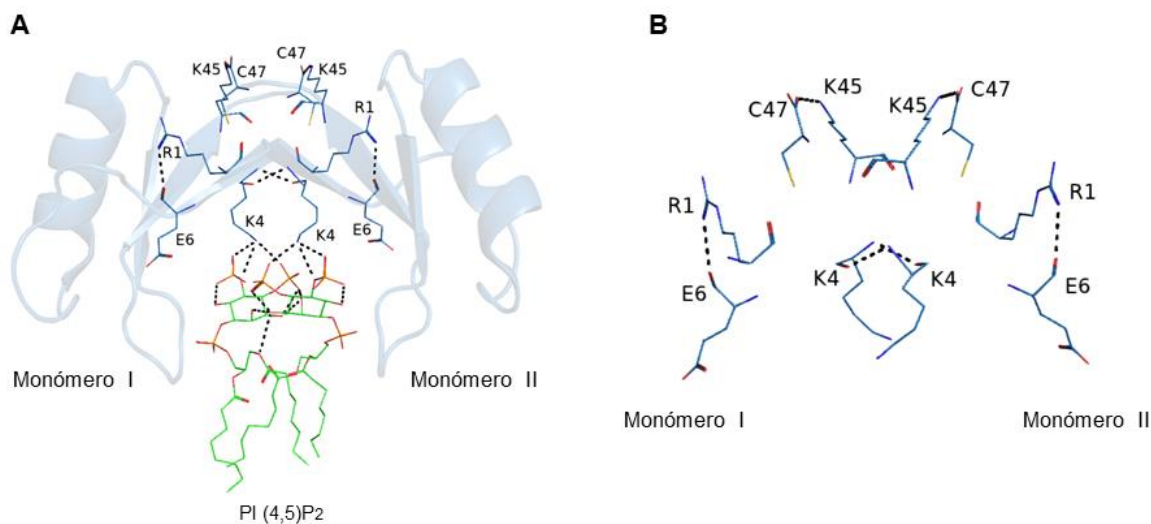


Figura 2.1. Determinantes estructurales del dímero NaD1 en la interacción con PIP₂. A) Determinantes de la estabilidad del dímero y de la unión a PIP₂. B) Residuos señalados en A sin las moléculas de lípido.

La secuencia primaria de J1-1 sin péptido señal (número de accesoión: PHT99254.1), se utilizó como templado a partir del cual se realizaron los cambios estructurales para obtener a las mutantes propuestas para este trabajo: J1-1_KTE (E4K, A5T y L6E) y J1-1_DEF4 (I35R, L39R y Q40R). J1-1_K45E (Fue previamente obtenida en el grupo de trabajo).

2.1.3. Alineamiento de secuencias peptídicas

Las secuencias de aminoácidos de J1-1 (número de accesoión: PHT99254.1) y mutantes se utilizaron para generar un alineamiento múltiple. El alineamiento múltiple, se realizó en el programa Bioedit (<https://bioedit.software.informer.com/>).

2.1.4 Análisis *in silico* del péptido J1-1 y mutantes

Las secuencias primarias de los péptidos J1-1 y mutantes (J1-1_KTE, J1-1_DEF4 y J1-1_K45E), se utilizaron para hacer una serie de análisis *in silico* con el objetivo de conocer los siguientes parámetros físico-químicos: peso molecular, punto isoeléctrico, carga total e índice GRAVY, en los servidores de ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) y Peptide Calculator (<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator>).

2.1.5. Determinación *in silico* del potencial de superficie

Análisis de potencial de superficie de J1-1 y las mutantes se obtuvieron en el programa PyMOL utilizando los parámetros establecidos por el programa.

2.1.6. Síntesis de gBlocks de mutantes de J1-1

Las secuencias codificantes de las defensinas mutantes J1-1_DEF4 y J1-1_KTE, se sintetizaron en Integrated DNA Technologies (IDT, <https://www.idtdna.com/pages>). Sitios de restricción, *Bam* *HI* y *Pst* *I* fueron agregados a ambos gBlocks (Fragmento de ADN con el CDS del péptido) en orientación 5' y 3' respectivamente, para su posterior clonación.

2.1.7. Clonación de los gBlocks mutantes en pGEM-TEasy

Se realizó la resuspensión de los gBlocks (ADN liofilizado, con la secuencia codificante del péptido) de las mutantes J1-1_KTE o J1-1_DEF4 siguiendo las instrucciones de los fabricantes (IDT, Integrated DNA Technologies), seguidamente, se hizo la reacción de adición de adeninas a los gBlocks con la finalidad de acondicionarlos molecularmente para sus respectivas clonaciones al plásmido pGEM-TEasy. Brevemente, un volumen de 50 µL de reacción conteniendo los siguientes componentes: H₂O libre de nucleasas, amortiguador thermopol (10 X), dATP (2 mM), gBlock (10 ng/µL) y Taq DNA polimerasa (5U/µL), se incubaron por 2 minutos a 68 °C.

Posteriormente se hicieron reacciones de ligación de cada gBlock (J1-1_KTE o J1-1_DEF4) con el plásmido pGEM-TEasy, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. En un volumen de 20 µL, se adicionó H₂O libre de nucleasas, amortiguador de ligación 2X, plásmido pGEM-TEasy, gBlock (J1-1_KTE o J1-1_DEF4) y DNA ligasa T4. La reacción se incubó a 4 °C durante toda la

noche. Finalmente, un volumen de 5 μL se utilizó para transformar cepas de *E. coli* DH5 α por choque térmico. Las células se plaquearon en medio LB agar adicionado con X-Gal, IPTG y ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ toda la noche.

2.1.8. Digestión de los plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4

Colonias de células de *E. coli* DH5 α previamente transformadas con pGEM-TEasy_J1-1_KTE o pGEM-TEasy_J1-1_DEF4, se analizaron mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos universales Fw_T7 (5'-GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG-3') y Rev_SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'), bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 ciclos de 1 minuto a 95 $^{\circ}\text{C}$, 50 segundos a 55 $^{\circ}\text{C}$ y 50 segundos a 68 $^{\circ}\text{C}$, con una extensión final de 5 minutos a 68 $^{\circ}\text{C}$. Las colonias positivas, se seleccionaron para crecer en medio LB adicionado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El medio saturado durante la noche, fue utilizado para purificar plásmido mediante el método explicado brevemente a continuación: el medio se centrifugó a 12,000 rpm en microtubos, el sobrenadante obtenido se desechó. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en la solución 1 (25 mM de Tris-HCl a pH 8, 10 mM de EDTA y 50 mM de glucosa) + RNAsa a 10 mg/mL. Después de incubarse por 5 minutos, se adicionó la solución 2 (0.2 M de NaOH y 1% de SDS), con la que se homogenizó y se incubó por 5 minutos. Posteriormente, se adicionó la solución 3 (3M de acetato de potasio + 11.5% de ácido acético y 28.5 mL de agua), con la que se incubó por 5 minutos en hielo. A continuación, se centrifugó a 12,500 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se recuperó, para ser tratado con dos volúmenes de etanol al 100%. La solución previa se centrifugó a 12,500 rpm y el sobrenadante se desechó. Posteriormente la pastilla se trató con etanol al 70% y se centrifugó a 12,500 rpm, el sobrenadante se desechó. Finalmente, la pastilla se incubó a temperatura ambiente (TA) para que los restos de etanol se evaporarán, seguidamente el ADN plasmídico se resuspendió en H₂O libre de nucleasas.

Los plásmidos purificados mediante el método previamente descrito, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI (enzimas de NEB, New England BioLabs). La reacción se realizó en un volumen de 100 μL , y se compuso de la siguiente forma: 10 μL de amortiguador #3 de NEB, 2 μL de la enzima correspondiente, 87 μL de plásmido purificado (dilución 1:50) y 1 μL de BSA (stock 100 X). La reacción se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. En paralelo, el plásmido pQE30 fue también digerido con las enzimas citadas para prepararlo para la ligación de los insertos liberados de los plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE o pGEM-TEasy_J1-1_DEF4.

Clones de los plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4, se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México).

2.1.9. Construcción de los plásmidos de expresión pQE30_J1-1_KTE y pQE30_J1-1_DEF4

Los plásmidos digeridos previamente (ver 2.1.8), se separaron en un gel de agarosa al 1.5% y las bandas correspondientes al peso molecular de cada inserto liberado se escindieron de los geles con bisturí estéril. La purificación de los insertos y el plásmido pQE30 se realizó con el kit comercial “Zymo Clean Gel DNA Recovery de Zymo Research”, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, las bandas de gel cortadas, se colocaron en microtubos donde se agregaron tres volúmenes del amortiguador ADB a cada tubo, seguidamente se incubaron a 37-55 °C por 5 a 20 minutos hasta que el gel se disolvió totalmente. La agarosa totalmente fundida se transfirió a columnas Zymo-spin y estas a su vez, se colocaron en tubos de colecta. A continuación, se centrifugó por 30-60 segundos a velocidad máxima y se descartaron los sobrenadantes. Luego se agregaron 200 µL de amortiguador “wash” a cada columna y se centrifugaron por 30 segundos, los sobrenadantes se desecharon. Este último paso de lavado, se repitió una vez más. Finalmente se agregó un volumen de 30 µL de amortiguador de “elución” a cada columna, y las columnas se colocaron en microtubos nuevos y estériles, donde se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad para eluir los insertos y el plásmido purificado.

Los insertos purificados, se ligaron al vector pQE30 en reacciones independientes de 20 µL, que incluyeron el amortiguador T4 ligasa de NEB (10 X), el inserto purificado, plásmido purificado pQE30 y enzima T4 ligasa de NEB. Las reacciones se incubaron a 4 °C por toda la noche, y seguidamente se usaron para transformar *E. coli* DH5α mediante choque térmico.

Colonias transformadas con ambos plásmidos, se utilizaron para saturar medio de cultivo a partir del que se extrajeron plásmidos mediante el método de extracción de plásmido descrito anteriormente. Los plásmidos extraídos sirvieron como templado para reacciones de PCR realizadas con los oligonucleótidos Fw pQE30 (5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC AC-3') y Rev pQE30 (5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: Desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 25 minutos, un paso de extensión final de 72 °C por 5 minutos. Las clonas positivas, se enviaron a secuenciar por ambos sentidos a MacroGen, Inc (Corea del Sur).

2.1.10. Expresión recombinante de J1-1 y mutantes

Células de *Escherichia coli* Origami fueron transformadas por choque térmico con los plásmidos recombinantes pQE30-J1-1, pQE30-J1-1_K45E, pQE30-J1-1_KTE, o pQE30-J1-1_DEF4 previamente secuenciados. Una colonia aislada de cada evento de transformación se colocó en medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C y 150 rpm durante toda la noche. Para iniciar los cultivos de inducción, se tomaron volúmenes de 5 mL y se adicionaron a volúmenes de 1000 mL de medio LB más ampicilina y se incubaron a 37 °C y 200 rpm. La densidad óptica del cultivo se evaluó a 600 nm hasta alcanzar 0.5, punto en el que se tomaron muestras correspondientes al cultivo sin inducir, al resto del cultivo se le adicionó IPTG a concentración final de 0.5 mM. El cultivo se mantuvo a 200 rpm y 37 °C por 16 horas.

2.1.11. Purificación de péptidos recombinantes

Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (Ni-NTA)

Después del tiempo de inducción, los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm y el sobrenadante se desechó. Las pastillas formadas se lavaron un par de veces con un amortiguador de Tris-HCl a 50 mM y pH de 7.5 (Amortiguador 1). Seguidamente, las pastillas se resuspendieron en el mismo amortiguador y se sonicaron utilizando un programa de 8 minutos con periodos de 40 segundos ON y 20 segundos OFF, con una amplitud del 40%. Al terminar la sonicación, se centrifugó todo el material sonicado a 8000 rpm por 10 minutos. Se recuperó la fracción soluble y las pastillas (fracción insoluble). 3 mL de resina Ni-NTA Superflow se equilibraron con el amortiguador 1 conteniendo 15 mM de imidazol. Particularmente para los péptidos J1-1_KTE y J1-1_DEF4 se tomó un volumen de ~ 7 mL del extracto soluble y se colocó en interacción con la resina previamente equilibrada. En contraste, las fracciones insolubles de J1-1 y J1-1_K45E, primero se solubilizaron con el amortiguador 1 adicionado con cloruro de guanidina a 6 M. Después de la solubilización, las mezclas se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó y a continuación, se colocó en interacción con una resina equilibrada con amortiguador 1 + cloruro de guanidina 6 M + 15 mM de imidazol.

La elución de los péptidos se realizó, variando la concentración de imidazol. J1-1_KTE y J1-1_DEF4, se eluyeron con el amortiguador 1 y concentraciones de imidazol de 0.25 M o 0.5 M. Estos péptidos fueron los que se utilizaron en los ensayos de reconocimiento a lípidos. En

contraste, para J1-1 y J1-1_K45E se usó el amortiguador 1 adicionado con guanidina 6 M y concentraciones de imidazol de 0.3, 0.7 o 1 M.

Purificación por HPLC de fase reversa (HPLC_{FR})

El segundo paso de purificación de los péptidos recombinantes, se hizo solo con las fracciones purificadas por Ni-NTA de J1-1 y J1-1_K45E en un equipo Agilent 1100 series HPLC value system. Para este segundo paso de purificación de fase reversa, se utilizó una columna semi preparativa C₁₈ (5C₁₈MS, 10 x 250 mm Nacalai-Tesque Japan). Las fases móviles fueron A (Ácido trifluoroacético 0.1 % en agua) y B (Ácido trifluoroacético 0.1 % en acetonitrilo). El método de purificación consistió en un gradiente que inició a los 10 minutos y fue de 10 hasta un 100 % del solvente B, con flujo constante de 1.5 mL⁻¹ en un tiempo total de 30 minutos. Fracciones purificadas de J1-1 y J1-1_K45E fueron secadas al vacío y resuspendidas en agua estéril. Estos péptidos fueron los que se utilizaron en los ensayos de reconocimiento a lípidos, ensayos de oligomerización y en los ensayos de actividad antibacteriana (artículo de investigación).

Paralelamente la masa de J1-1_K45E, se determinó mediante espectrometría de masas en el departamento de servicios de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México).

2.1.12. Perfiles de los péptidos purificados en SDS-PAGE

Los perfiles de los péptidos recombinantes purificados, se observaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y de condiciones reductoras al 15% de concentración. La electroforesis se realizó a 120 volts. Las proteínas estándares de peso molecular empleadas corresponden a Prestained SDS-PAGE Standards, broad range (BIO-RAD) y marcadores de amplio rango (# 3437, Sigma). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) para la inmunodetección de los péptidos o se tiñeron con Coomassie R-250 Brilliant Blue (10% ácido acético + 40% de metanol) durante toda la noche. Los geles se destiñeron con una solución de ácido acético y metanol al 10 y 40% respectivamente.

Para observar con mayor sensibilidad los perfiles de los péptidos recombinantes en los SDS-PAGE, se utilizó la tinción con nitrato de plata (Heukeshoven y Dernick, 1985). Después de la electroforesis de proteínas, el gel se colocó en una solución de fijación compuesta de metanol (25%), ácido acético (10%) y formaldehído (0.075%) por 60 minutos a TA. Seguidamente, lavados con metanol al 30% y en agitación constante fueron realizados. Después de los lavados,

el gel se colocó en una solución de tiosulfato de sodio al 0.02% por 1 minuto. A continuación, el gel se incubó en una solución de nitrato de plata al 0.2% y 0.075% de formaldehído por 20 minutos en oscuridad. Después del tiempo de incubación el gel se lavó con agua destilada y finalmente se reveló en una solución de carbonato de sodio anhidro al 6%, formaldehído al 0.05% y tiosulfato de sodio al 0.02%. La reacción se realizó en agitación constante a TA y se detuvo con una solución de metanol al 25% y ácido acético al 10%.

2.1.13. Western blot con el anticuerpo policlonal anti-J1

SDS-PAGEs se transfirieron a membranas de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) en una cámara húmeda con un amortiguador compuesto de Tris (25 mM), glicina (192 mM) y metanol (20%) a pH de 8.3, a un voltaje de 30 volts por 15 horas. La inmunodetección se realizó de la siguiente manera: después de la transferencia, la membrana se bloqueó con un amortiguador TBS-T 1X (Tris 20 mM, pH 7.6 + NaCl a 150 mM + Tween 20 al 0.1%) más BSA al 3% (Sigma A 7906 St. Louis, MO) y se incubó por 60 minutos a TA y agitación constante. A continuación, se desechó el amortiguador de bloqueo y se lavó un par de veces a TA con amortiguador TBS-T 1X. Seguidamente, una dilución de anti-J1-1 (anticuerpo generado previamente en el laboratorio, dilución 1:10,000) en TBS 1X (Tris 20 mM, pH 7.6 + NaCl a 150 mM) se agregó a la membrana por 30 minutos a TA, al finalizar se hicieron un par de lavados con TBS-T 1X. El anticuerpo secundario fue un anti-conejo acoplado a HRP (dilución 1:10,000; Sigma -Aldrich 32160702), el cual se agregó a la membrana y se incubó por 20 minutos. Posteriormente, se realizaron un par de lavados con TBS-T 1X para finalmente revelar la señal de quimioluminiscencia con el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore corporation) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. La señal fue detectada y digitalizada en un ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD).

2.1.14. Cuantificación de proteínas

Los péptidos purificados por cromatografía de afinidad Ni-NTA (J1-1_KTE y J1-1_DEF4) y HPLC_{FR} (J1-1 y J1-1_K45E), se cuantificaron por el ensayo Bradford. Brevemente, diluciones del péptido purificado se agregaron a tubos de ensayo, donde se adicionó H₂O bidestilada hasta alcanzar un volumen de 0.8 mL. Seguidamente se agregó 0.2 mL de reactivo de Bradford (Bradford, 1976). La absorbancia de la mezcla resultante se obtuvo a 595 nm. La concentración de péptido en las muestras se determinó por interpolación del valor de la absorbancia en la curva

de referencia, cuyos valores de absorbancia fueron generados a partir de concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (Bradford, Bio-Rad Protein Microassay, # cat. 5000001).

2.1.15. Análisis de la interacción péptido-lípido *in vitro*

Las interacciones péptido-lípido, se realizaron en membranas P-6001 PIP (membranas de nitrocelulosa de 2 x 6 cm) precargadas con 100 pmol de ocho fosfoinosítidos y otros siete lípidos de importancia biológica (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT). Los lípidos son: Ácido lisofosfatídico (LPA), Lisofosfocolina (LPC), Fosfatidilinositol (PtdIns), Fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns (3) P), Fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns (4) P), Fosfatidilinositol-5-fosfato (PtdIns (5) P), Fosfatidiletanolamina(PE), Fosfatidilcolina (PC), Esfingosina 1-fosfato(S1P), Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PtdIns (3,4) P₂), Fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PtdIns (3,5) P₂), Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns (4,5) P₂), Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns (3,4,5) P₃), Ácido fosfatídico (PA) y Fosfatidilserina (PS). El revelado de las interacciones de J1-1 y sus mutantes con los lípidos, se realizó de forma similar al revelado del Western blot previamente descrito, con una variante que consistió en agregar 1 µg/mL del péptido correspondiente en amortiguador TBS 1X (Tris 20 mM, pH 7.6 + NaCl a 150 mM) e incubar por 30 minutos a TA, justo después de retirar la solución de bloqueo de la membrana y de un par de lavados con TBS-T 1X. Seguidamente, se retiró la solución con el péptido, y se lavó un par de veces con TBS-T 1X y se continuo de manera similar a lo descrito para el Western blot con la inmediata aplicación del anticuerpo anti-J1-1.

CAPÍTULO III

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Características físico-químicas de J1-1 y mutantes.

Los péptidos utilizados en este trabajo tienen longitudes de 64 (J1-1 y J1-1_K45E) y 60 amino ácidos (J1-1_KTE y J1-1_DEF4) que corresponden a la suma de las regiones maduras de los péptidos y los residuos fusionados en el N-terminal, y que son necesarios para la purificación por Ni-NTA (Figura 3.1. A). Entre las propiedades que se evaluaron *in silico* para cada uno de los péptidos fueron: punto isoeléctrico con valores entre 8.19 y 9.33, carga total a pH 7 con valores que van de 2.19 a 7.19 y el índice GRAVY (Grand Average of Hydropathy) -0.702 a -0.427 (Figura 3.1. B). Siendo este último un parámetro de la polaridad del péptido, si el valor es positivo el péptido es polar, en contraste, si el valor es negativo el péptido es considerado de naturaleza no polar.

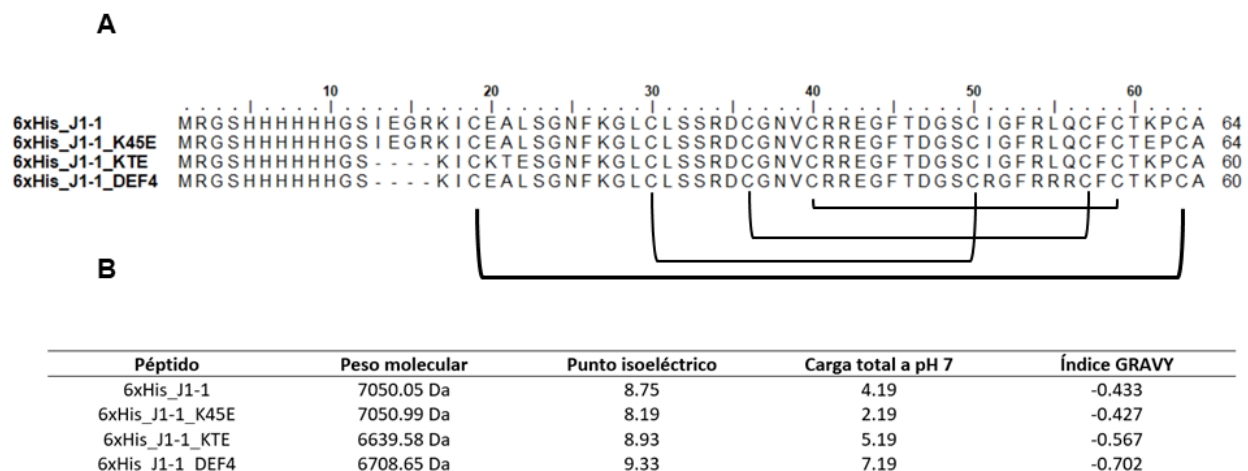


Figura 3.1. Estructura primaria y características físico-químicas de los péptidos recombinantes. A) Alineamiento de aminoácidos de J1-1 y mutantes; B) Propiedades físico-químicas de los péptidos. En A, a la derecha el número de amino ácidos en cada péptido y abajo, el patrón de enlaces disulfuro característico en defensinas de plantas (C1-C8, C2-C5, C3-C6 y C4-C7).

3.1.2. Potencial de superficie de J1-1 y mutantes

Los resultados del análisis de potencial de superficie en los péptidos, mostró variaciones en la distribución de los patrones de carga, lo cual era esperado debido a las diferencias en las

secuencias de aminoácidos de cada péptido. Se observó que existe mayor densidad de carga positiva en las mutantes J1-1_KTE y J1-1_DEF4 comparado con J1-1 (Figura 3.2).

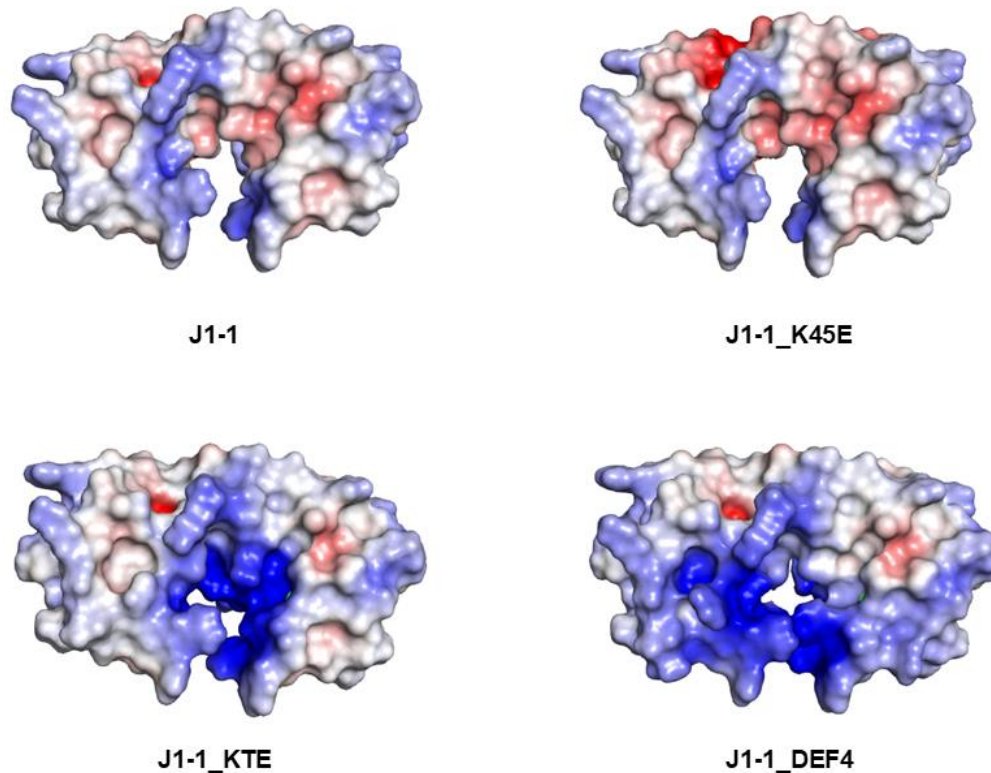


Figura 3.2. Potencial electrostático de superficie en J1-1 y mutantes. Código de colores: Azul, carga positiva; rojo, carga negativa y blanco, carga neutra.

3.1.3. Obtención de plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4

Los análisis de PCR a partir de plásmidos purificados de colonias transformadas previamente con pGEM-TEasy_J1-1_KTE o pGEM-TEasy_J1-1_DEF4, amplificaron productos de 300 pb, lo cual equivale al tamaño del amplicon esperado (Figura 3.3).

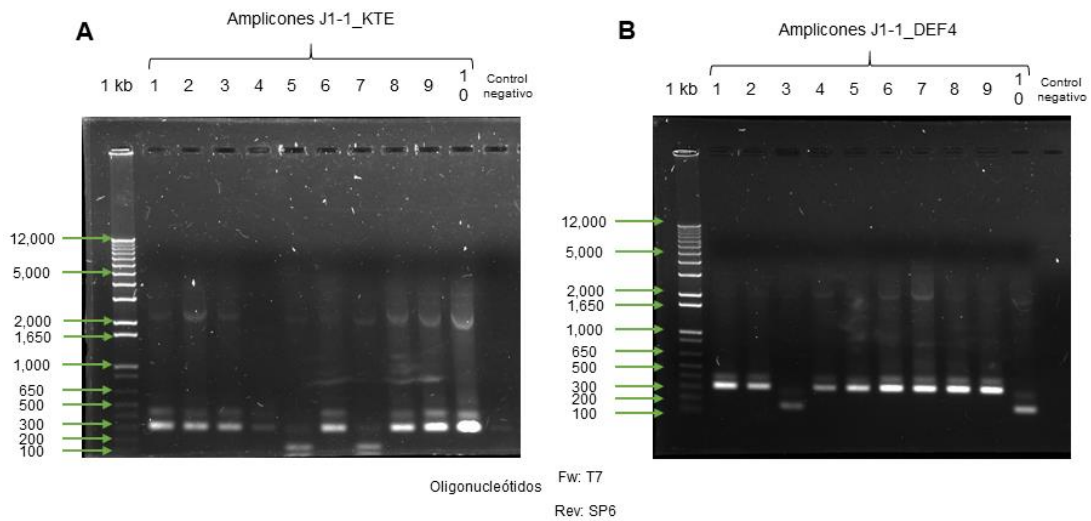


Figura 3.3. Amplificación de secuencias mutantes de J1-1 a partir de plásmidos pGEM-TEasy. Geles de agarosa al 1%, amplicones de *J1-1_KTE* (A) y *J1-1_DEF4* (B). Parte superior: 1 Kb, marcador de peso molecular; 1-10, ADN templado (plásmido purificado de colonias previamente transformadas con el plásmido correspondiente). Oligonucleótidos utilizados: forward T7 y como reverso SP6.

Los resultados de secuenciación de los plásmidos pGEM-TEasy_J1-1_KTE y pGEM-TEasy_J1-1_DEF4, confirmaron la clonación de las secuencias de nucleótidos codificantes de las mutantes. Cada ADN clonado tiene sitios para corte con enzimas de restricción (*Bam HI* y *Pst I*) y la secuencia codificante del péptido mutante. En la figura 3.4 se observan las secuencias codificantes de los péptidos clonados en los plásmidos pGEM-TEasy. Estas clonas, sirvieron como plantillas para la sub clonación en el vector de expresión pQE30.

A

>pGEM-TEasy_J1-1_KTE1_REV

CRTTTCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCTGCAGTTAAGCACAGGGCTTCGTGCAGA
 AGCATTGAAGACGGAATCCAATGCAAGAGCCATCGGTAAATCCCTCTCTACGGCAAACATTACCACAATCGCGG
 GCTACTAAGGCACAACCCCTTGAAGTTGCCGCTCTCCGCTTCGCATATTTGGATCCAATCACTAGTGAATTC

B

>pGEM-TEasy_J1-1_DEF4_1_Rev

CRTGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCTGCAGTTAAGCACAGGGCTTCGTGCAGAAG
 CATCGACGACGGAATCCACGGCAAGAGCCATCGGTAAATCCCTCTCTACGGCAAACATTACCACAATCGCGGC
 TACTAAGGCACAACCCCTTGAAGTTGCCGCTCAACGCCTCGCATATTTGGATCCAATCACTAGTGAATTCGC

Figura 3.4. Resultados de secuenciación de los plásmidos pGEM-TEasy. A) Secuencia del plásmido pGEM-TEasy_J1-1_KTE (A). B) pGEM-TEasy_J1-1_DEF4. En rojo, los sitios de restricción (*Bam* *HI* o *Pst* *I*); en amarillo, la secuencia codificante de los péptidos péptidos maduros.

3.1.4. Obtención de los plásmidos de expresión pQE30_J1-1_KTE y pQE30_J1-1_DEF4

El vector pQE30 y los gBlocks con las secuencias codificantes de J1-1_KTE o J1-1_DEF4 digeridos con *Bam* *HI* y *Pst* *I*, se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 3.5). Bandas correspondientes a pesos moleculares de ~ 3 kb, ~ 250 pb y ~ 250 pb fueron observadas en el gel para pQE30, J1-1_KTE y J1-1_DEF4 respectivamente.

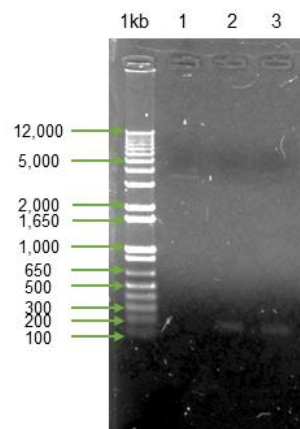


Figura 3.5. Purificación de vector pQE30 e insertos J1-1_KTE o J1-1_DEF4 previamente digeridos con enzimas de restricción. Gel de agarosa al 1.5%. Parte superior: 1 kb, marcador de peso molecular; 1, vector pQE30 purificado; 2, J1-1_KTE purificado; 3, J1-1_DEF4 purificado.

El vector y los gBlocks digeridos, se purificaron y se ligaron a como se describe en 2.1.9, seguidamente células de *E. coli* DH5 α se transformaron por choque térmico. A partir de colonias aisladas se extrajo plásmidos, y se usaron para amplificación por PCR de los insertos de J1-1_KTE y J1-1_DEF4. Por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, se observaron los amplicones de 377 pb correspondiente a cada gen (Figura 3.6). De las 7 clonas de pQE30-J1-1_KTE analizadas, todas resultaron positivas. En contraste, las construcciones conteniendo *J1-1_DEF4*, solo las clonas 1 y 2 fueron aceptadas como positivas. Paralelamente plásmido pQE30 vacío (sin las secuencias codificantes de las mutantes), se utilizó como templado en reacciones de PCR obteniendo amplicones de 203 pb.

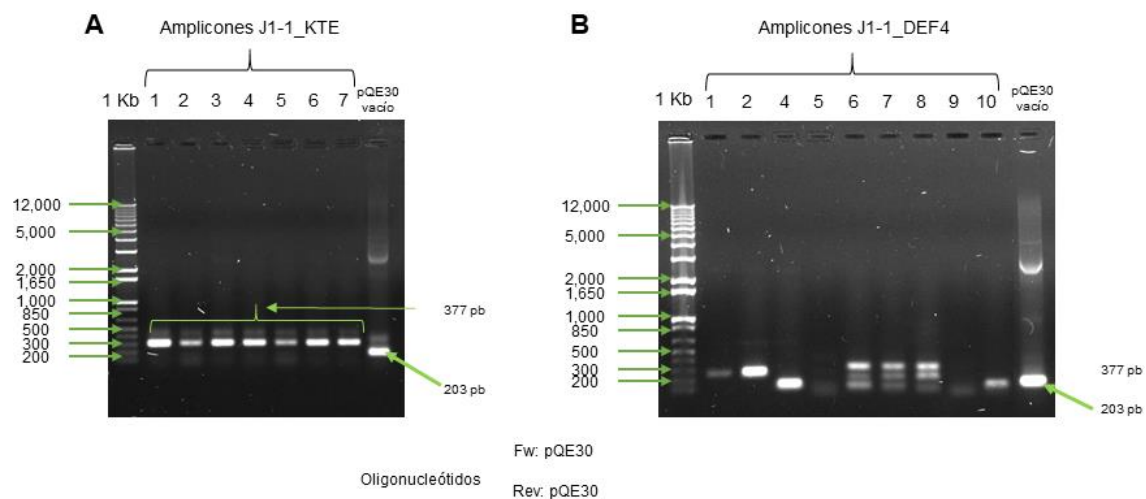


Figura 3.6. Amplificación a partir de vector pQE30 del inserto J1-1_KTE o J1-1_DEF4. Geles de agarosa al 1%. A) Amplicon de J1-1_KTE. B) Amplicon de J1-1_DEF4. Parte superior: 1 Kb, marcador de peso molecular; 1-7 o 1-10, productos de PCR. Oligonucleótidos forward pQE30 y reverso pQE30, se usaron en la reacción de PCR.

Los resultados de secuenciación de los vectores pQE30_J1-1_KTE y pQE30_J1-1_DEF4 confirmaron la clonación de los fragmentos de ADN codificantes en el vector de expresión pQE30 (Figuras 3.7 y 3.8), también se confirmó la conservación del marco de lectura de otros elementos en *cis* necesarios para la expresión y purificación de los péptidos recombinantes.

```

>pQE30_J1-1_KTE1_Fw
GATGAGGAGGAGATTAAGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCAAAATA
TGCAAGACGGAGAGCGGCAACTTCAAGGGGTTGTGCCTTAGTAGCCGCGATTGTGGTAATG
TTTGCCGTAGAGAGGGATTTACCGATGGCTCTTGCATTGGATTCCGTCTTCAATGCTTCTG
CACGAAGCCCTGTGCTTAACTGCAGCCAAGCTTAATAGCTGAGCCTTGGACTCCTGTTGAT

6xHis_J1-1_KTE
MRGSHHHHHHGSKICTESGNFKGLCLSSRDCGNVCRREGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCAs
top

```

Figura 3.7. Secuencia del plásmido pQE30 conteniendo la secuencia codificante de la mutante J1-1_KTE. A) Secuencia de nucleótidos de J1-1_KTE en el vector pQE30. B) Residuos aminoácidos del péptido de fusión. En negritas, codón de inicio de la traducción (ATG) y terminación (TAA, TAG y TGA); verde, etiqueta de histidinas; rojo, sitios de restricción *Bam* HI y *Pst* I; amarillo, secuencia codificante de J1-1_KTE; azul, sitios mutados respecto a J1-1.

```

>pQE30_J1-1_DEF4.2_Fw
GAATAATAGGAGGAGAATTAAGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCAA
AATATGCGAGGCGTTGAGCGGCAACTTCAAGGGGTTGTGCCTTAGTAGCCGCGATTGTGGT
AATGTTTGCCGTAGAGAGGGATTTACCGATGGCTCTTGCCGTGGATTCCGTCGTCGATGCT
TCTGCACGAAGCCCTGTGCTTAACTGCAGCCAAGCTTAATAGCTGAGCCTTGGACTCCTGT

6xHis_J1-1_DEF4
MRGSHHHHHHGSKICEALSGNFKGLCLSSRDCGNVCRREGFTDGSCRGFRRRCFCTKPCAs
top

```

Figura 3.8. Secuencia del plásmido pQE30 conteniendo la secuencia codificante de la mutante J1-1_DEF4. A) Secuencia de nucleótidos de J1-1_DEF4 en el vector pQE30. B) amino ácidos que componen el péptido de fusión. En negritas, codón de inicio de la traducción (ATG) y terminación (TAA, TAG y TGA); verde, etiqueta de histidinas; rojo, sitios de restricción *Bam* HI y *Pst* I; amarillo, secuencia codificante de J1-1_DEF4; azul, sitios mutados respecto a J1-1.

3.1.5. Péptidos recombinantes purificados por Ni-NTA y HPLC_{FR} e inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-J1-1

Los péptidos recombinantes (J1-1, J1-1_K45E, J1-1_KTE y J1-1_DEF4), se purificaron por cromatografía de afinidad a través de Ni-NTA (Figura 3.9) siguiendo la metodología previamente reportada por Guillén-Chable *et al.*, (2017), con modificaciones para J1-1_KTE (Figura 3.9 C) y J1-1_DEF4 (Figura 3.9 D).

Análisis de los perfiles de péptidos purificados se observaron en geles de poliacrilamida al 15%. Bandas de ~6.5, ~14.4 y ~21.5 kDa se observaron en los carriles del 6 al 9 de la purificación por afinidad (Ni-NTA) de J1-1 y J1-1_K45E (Figura 3.9, A y B). Las bandas observadas corresponden a las formas monoméricas, diméricas y triméricas de cada péptido. En el caso de la purificación por afinidad de los péptidos J1-1_KTE y J1-1_DEF4, bandas con pesos equivalentes a las formas previamente descritas no fueron observadas. En las eluciones de J1-1_KTE y J1-1_DEF4 obtenidas con 250 mM de imidazol (Figura 3.9, C y D carriles # 5) se observó un patrón de bandas de amplio peso molecular con la mayor abundancia de proteínas comparada a las eluciones restantes (carriles 6 al 8), se identificó una banda mayoritaria entre los 45 y 66.2 kDa. Estos perfiles no fueron claros al momento de concluir si se habían expresado y purificado a ambos péptidos recombinantes, pues en las eluciones observadas en los carriles 5 (Figura 3.9, C y D) se observaron igualmente algunas bandas de peso molecular bajo (entre 6.5 y 21.5 kDa) que putativamente podrían corresponder a los péptidos purificados.

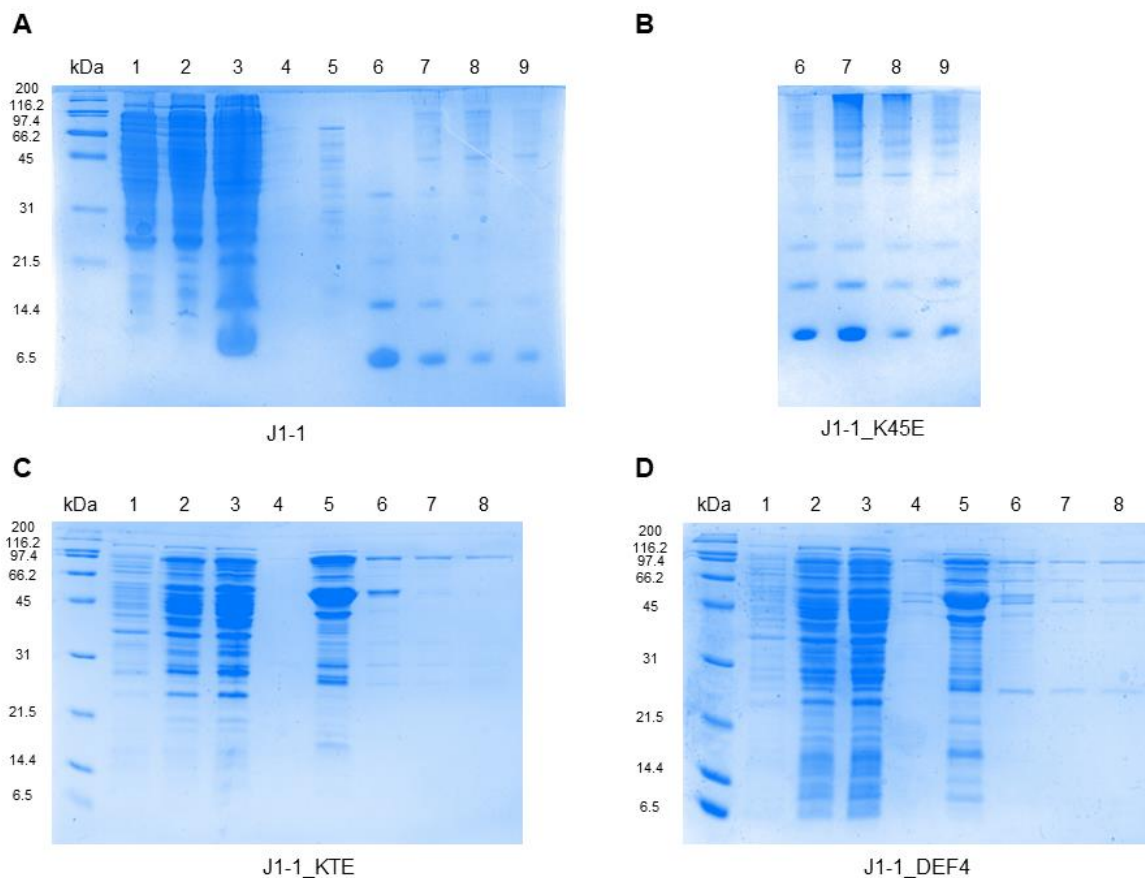


Figura 3.9. Perfiles de purificación por Ni-NTA de los péptidos recombinantes. A) J1-1; B) J1-1_K45E; C) J1-1_KTE y D) J1-1_DEF4. Parte superior (J1-1): kDa, marcador de peso molecular; 1, fracción insoluble

no inducida; 2, fracción soluble inducida; 3, fracción insoluble inducida; 4, extracto solubilizado; 5, fracción no unida; 6, elución con 300 mM de imidazol; 7, elución con 700 mM; 8, elución con 700 mM; 9, elución con 1 M de imidazol. Parte superior (J1-1_K45E): eluciones 6-9 se obtuvieron con concentraciones idénticas de imidazol de 300 mM a 1 M de imidazol utilizadas para la elución de J1-1. Parte superior (J1-1_KTE y J1-1_DEF4): kDa, marcador de peso molecular; 1, fracción soluble no inducida; 2, fracción no unida; 3, lavados de columna; 4, elución con 250 mM de imidazol; 5, elución con 250 mM; 6, elución con 250 mM; 7, elución con 500 mM; 8, elución con 500 mM.

Debido a que en el análisis por SDS-PAGE de los péptidos J1-1_KTE y J1-1_DEF4 no se observó un perfil concluyente, se realizó tinción con nitrato de plata del SDS-PAGE conteniendo las eluciones con 250 mM de imidazol de ambos péptidos (Figura 3.10). El principio del uso de esta tinción fue porque es un método con mayor sensibilidad en la detección, es decir, en caso de haber proteína que no alcanzará el límite de detección con la tinción con Coomassie, muy probablemente sería posible identificarla con este método. En efecto, se observó una banda que probablemente corresponde al dímero de J1-1_KTE (Figura 3.10, carril 2). En contraste, dos bandas con la masa molecular aparente del dímero J1-1_DEF4 (~14 kDa) se observaron en los carriles 4 y 5. A partir de estos resultados, se propuso realizar ensayos de Western blot con las eluciones mostrando la presencia del dímero putativo.

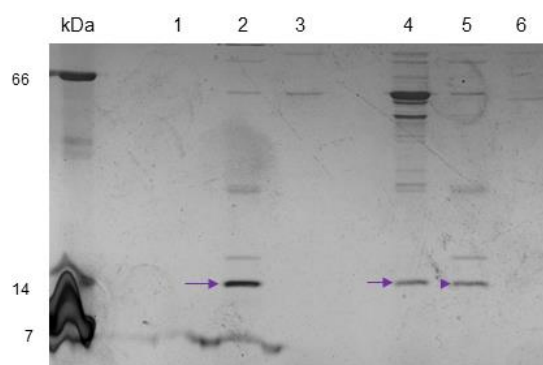


Figura 3.10. Purificación por Ni-NTA de J1-1_KTE y J1-1_DEF4. Parte superior: kDa, marcador de peso molecular; 1-3, fracciones de J1-1_KTE eluidas con 250 mM; 4-6, J1-1_DEF4 eluidas con 250 mM de imidazol. Flechas moradas, indican la presencia de bandas de proteínas correspondientes al dímero de cada péptido.

El perfil de los péptidos purificados por Ni-NTA (J1-1_KTE y J1-1_DEF4) y HPLC_{FR} (J1-1 y J1-1_K45E) se observaron por SDS-PAGE al 15% (Figura 3.11) y se inmunodetectaron con un anticuerpo policlonal anti-J1-1 (Dilución 1:10,000). En el análisis en gel, se observa la proteína BSA en el carril 1, monómero, dímero y trímero de J1-1 y J1-1_K45E en los carriles 2 y 3 respectivamente con pesos moleculares de ~7, ~14 y ~21 kDa. En el carril 4 correspondiente a J1-1_KTE se observa una escalera de proteínas con diversos pesos moleculares que van de menor a mayor masa, y donde la banda más prominente es la ubicada entre 40 y 55 kDa. En el carril 5 para J1-1_DEF4, se observó un perfil distinto al observado para los demás péptidos. Es importante señalar, que las eluciones de J1-1_KTE y J1-1_DEF4 usadas para el Western blot, fueron las que se analizaron previamente en el gel teñido con nitrato de plata, y en las que se observó la presencia de los dímeros.

En el ensayo de Western blot, se detectó el monómero, dímero y trímero de J1-1 (Figura 3.11 B, carril 2) y J1-1_K45E (Figura 3.11 B, carril 3). Para J1-1_KTE, se observó el monómero, dímero y trímero (carril 4), aunque aparentemente, J1-1_KTE fue también inmunodetectada en formas oligoméricas de mayor masa molecular. En J1-1_DEF4, se observaron señales débiles de posiblemente bandas correspondientes al dímero y trímero (carril 5), además de otras bandas con mayor señal que fueron también observadas en el perfil de inmunodetección de J1-1_KTE. De acuerdo con estos resultados, se decidió continuar con la caracterización del péptido J1-1_K45E (ver artículo en la sección de anexos). J1-1_KTE y J1-1_DEF4 purificados por Ni-NTA, solo se utilizaron para explorar su perfil de unión a lípidos.

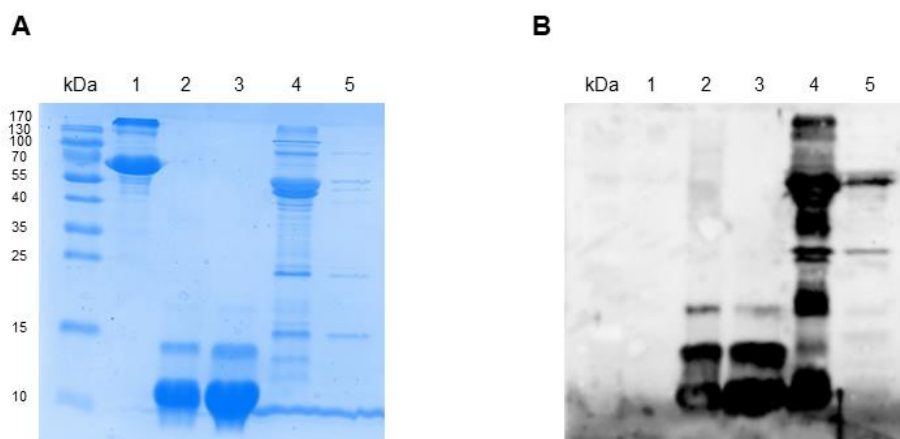


Figura 3.11. Inmunodetección de los péptidos recombinantes con el anticuerpo anti-J1-1. A) SDS-PAGE. B) Western blot. Parte superior: kDa, marcador de peso molecular; 1, albúmina sérica bovina; 2, J1-1 (HPLC_{FR}); 3, J1-1_K45E (HPLC_{FR}); 4, J1-1_KTE (Ni-NTA); 5, J1-1_DEF4 (Ni-NTA).

3.1.6. Análisis de interacción lípido-péptido *in vitro*

El perfil de unión a lípidos de J1-1 fue previamente caracterizado. J1-1 se une a PtdIns monofosfatos, PtdIns bisfosfatos, PtdIns trisfosfato y PA. En contraste, cada mutante obtenida en este trabajo mostró su particular perfil de unión a lípidos (Figura 3.12). J1-1_KTE se unió a PtdIns monofosfatos, PtdIns (3,5) P₂, PtdIns (4,5) P₂, PtdIns trisfosfato y PA. J1-1_DEF4 se unió a PtdIns (3) P, PtdIns (4) P, PtdIns (3,5) P₂ y PA. Finalmente, J1-1_K45E se unió a PtdIns (4,5) P₂, PtdIns (3,4,5) P₃, PA y PS. J1-1_K45E y J1-1_DEF4 fueron los péptidos que se unieron a un menor número de lípidos en comparación a J1-1. J1-1_K45E fue también el único péptido en unirse a PS un lípido no reconocido previamente por J1-1. Además, J1-1_K45E no se unió a PtdIns monofosfatos comparado a J1-1.

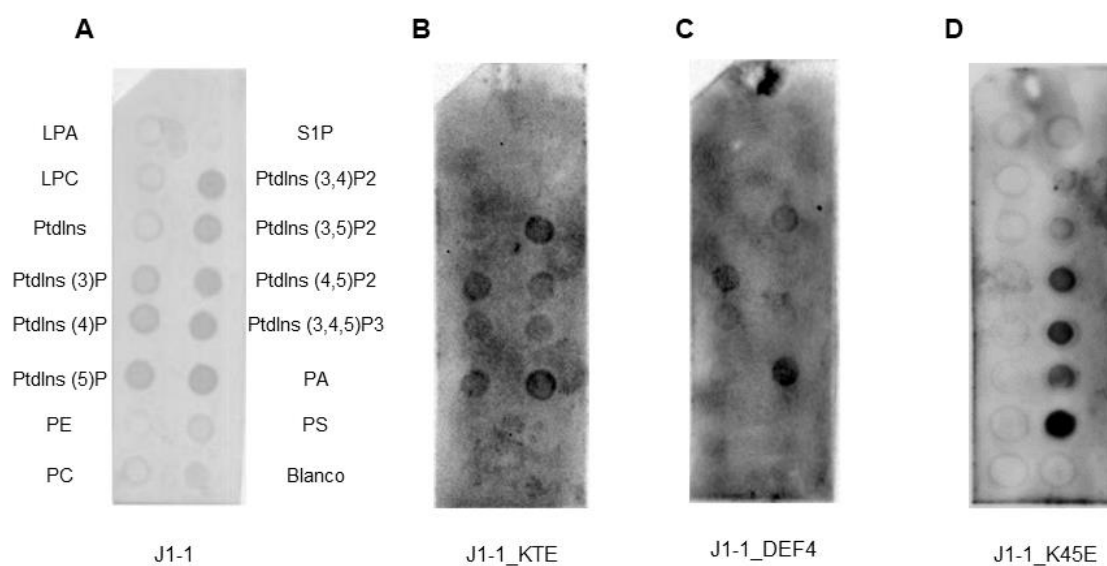


Figura 3.12. Perfil de unión a lípidos de los péptidos recombinantes. A) J1-1, B) J1-1_KTE, C) J1-1_DEF4 y D) J1-1_K45E.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN GENERAL

La metodología para la expresión recombinante y purificación de la defensina J1-1 fue establecida a partir de células de *E. coli* Origami (Guillén-Chable *et al.*, 2017). En el presente trabajo, se reporta la purificación por cromatografía de afinidad de J1-1_KTE y J1-1_DEF4 y la de J1-1_K45E por afinidad y por HPLC_{FR} siguiendo la metodología previamente descrita para J1-1. En este trabajo de investigación, nos enfocamos en la caracterización de la unión a lípidos, la formación de oligómeros en presencia o ausencia de PA, y la actividad antibacteriana de J1-1_K45E (artículo en la sección de anexos). La caracterización se concluyó únicamente con esta mutante debido a que se obtuvo después de la expresión recombinante y los dos pasos de purificación en suficiente cantidad y con características similares a J1-1. Esta mutante puntual tiene un residuo de glutamato en lugar de un residuo de lisina en la posición 45 del péptido maduro J1-1. El péptido se purificó a partir de cuerpos de inclusión como péptido de fusión con una etiqueta de seis residuos de histidinas en el N-terminal, seguido de una secuencia de reconocimiento para la proteasa factor Xa. Después de la purificación, se observaron en el SDS-PAGE bandas correspondientes a los tamaños de monómeros, dímeros y trímeros e incluso mayores (oligómeros) de J1-1_K45E en ausencia de lípidos. Paralelamente, se realizó un ensayo de Western blot con anticuerpos policlonales anti-J1-1. Los anticuerpos policlonales detectaron los mismos oligómeros después de la reducción y desnaturalización por temperatura, hecho que sugiere que las formas observadas permanecen estables en esas condiciones, lo cual podría esperarse debido a las propiedades termo-resistentes de las defensinas de plantas (Woytowich y Khachatourians, 2001) relacionadas a la formación de sus enlaces disulfuros característicos de la estructura CS α β . Mientras que las tinciones con azul de Coomassie no fueron suficientes para identificar diferencias entre J1-1 y J1-1_K45E en cuanto al perfil de oligomerización después del entrecruzamiento y compararlo con el análisis previo en geles de SDS-PAGE de las fracciones purificadas de J1-1 por Ni-NTA (Guillén-Chable *et al.*, 2017), los ensayos de Western blot permitieron observar monómeros, dímeros, trímeros y especies oligoméricas de mayor masa molecular. Resultado distinto al obtenido con los anticuerpos anti-His, que solo reconocieron a monómeros y dímeros de J1-1.

Particularmente para J1-1_KTE y J1-1_DEF4, un primer análisis de expresión mostró mayor presencia de ambos en las fracciones solubles, por lo que se decidió escalar el cultivo inicial y

purificarlos a partir de fracción soluble. No obstante, después de la purificación por Ni-NTA y su análisis por SDS-PAGE no se observaron péptidos con los tamaños esperados correspondientes a los monómeros y dímeros (de 7 y 14 kDa) como los observados para J1-1 y J1-1_K45E. Aunque se observaron bandas de bajo peso molecular las proteínas purificadas se observaron en los tamaños de ~ 31 kDa, y una banda prominente con un tamaño entre los 45 y 66.2 kDa. Debido al perfil de ambos péptidos enriquecidos con proteínas de alto peso molecular y a la ausencia de los péptidos con los tamaños esperados, se optó por no purificar por HPLC_{FR} a las fracciones eluidas de Ni-NTA con imidazol. Con el objetivo de observar la presencia de cantidades en el orden de nanogramos de cada péptido, se realizaron tinciones con nitrato de plata en geles de SDS-PAGE. La tinción con nitrato de plata de muestras de proteínas eluidas con imidazol a 250 mM de J1-1_KTE y J1-1_DEF4, mostraron la presencia de bandas de ~ 14 kDa correspondientes a los dímeros de ambos péptidos. Con base en el resultado de la tinción con nitrato de plata, se realizó un análisis de Western blot con anticuerpos policlonales anti-J1-1, los que en principio tendrían la capacidad de reconocer múltiples epitopes en J1-1 recombinante. En el ensayo de inmunodetección se identificaron el monómero, dímero y trímero de J1-1_KTE, y se observaron bandas muy débiles que corresponderían al dímero y trímero de J1-1_DEF4, este resultado sugiere que estos péptidos también son termo-resistentes. Respecto a las bandas inmunodetectadas de mayor masa molecular, es importante recordar que ambos péptidos fueron purificados por afinidad, y muy probablemente los péptidos recombinantes pudieron co-purificar con proteínas endógenas de *E. coli*. Sobre las cantidades bajas de proteínas recuperadas de la purificación por afinidad, proponemos las siguientes hipótesis:

1. La purificación a partir de fracción soluble, brinda las condiciones para una mejor estabilidad de los péptidos mutantes recombinantes comparado a un ambiente con la presencia de cloruro de guanidina, por lo que se favorecería la formación de oligómeros estables, lo cual podría dar origen a las bandas correspondientes a 31 y entre 45 y 66 kDa observadas para ambos péptidos purificados.
2. Los péptidos forman oligómeros estables o interactúan de forma aún no descrita con proteínas de *E. coli*.
3. La actividad de los péptidos recombinantes (monómero y dímero) es altamente tóxica para el hospedero, disminuyendo su expresión o favoreciendo su degradación por algún mecanismo celular aún no descrito.

Basado en los resultados del Western blot y SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, se decidió realizar los ensayos de unión a lípidos de las fracciones purificadas de J1-1_KTE y J1-1_DEF4 en membranas P-6001.

La actividad antimicrobiana de las defensinas se ha ligado en parte a su naturaleza catiónica. Además, estos péptidos se han distinguido por ser moléculas que se unen a lípidos. Por lo tanto, esta característica se ha considerado como el primer paso en el proceso de lisis de membrana, y también como un requisito para la translocación de los péptidos a través de la membrana, en particular para defensinas que luego van a unirse a ligandos intracelulares (Tam *et al.*, 2015). El ensayo de unión a lípidos de J1-1_K45E en membranas P-6001, dejó ver que este péptido se une a PtdIns (4,5) P₂, PtdIns (3,4,5) P₃, PA y PS. En contraste, J1-1 se une a PtdIns monofosfatos, PtdIns (3,4) P₂, PtdIns (3,5) P₂, PtdIns (3,4,5) P₃ y a PA, pero no a PS. Estas diferencias en el perfil de unión a lípidos, sugieren un rol de K45, que, al ser sustituido por un aminoácido con cadena lateral de carga negativa, propicia un cambio en el potencial electrostático en la superficie, extendida en la imagen del dímero (anexo: artículo, figura 5); esto modificaría las interacciones descritas de los extremos N-C terminales para la formación o estabilidad de los dímeros, las interacciones entre dímeros y el perfil de unión a fosfolípidos.

Los perfiles de unión a lípidos de J1-1_KTE y J1-1_DEF4, fueron distintos al de J1-1. La mutante J1-1_KTE se unió a todos los lípidos que J1-1 reconoció con excepción del PtdIns (3,4) P₂; J1-1_DEF4, solo se unió a 4 lípidos de los 8 reconocidos por J1-1, estos fueron: dos monofosfatos, PtdIns (3) P, PtdIns (4) P; un bis-fosfato, PtdIns (3,5) P₂ y a PA. Es interesante que J1-1_KTE no se unió al PtdIns (3,4) P₂, cuando tiene la capacidad de unirse a los fosfatos del inositol en las posiciones 3, 4 y 5 en su conformación como PtdIns monofosfatos y en forma de PtdIns (3,4,5) P₃. Una explicación podría ser que en su forma dimerica u oligomérica durante la interacción con los lípidos, J1-1_KTE perdiera la capacidad de interactuar con el fosfato 4 del PtdIns (3,4) P₂ por rearrreglos de las cadenas laterales con carga como son K4 y E6. En el caso de J1-1_DEF4 y de acuerdo a los resultados, ocurre un cambio mayor en la configuración de las determinantes de unión a los lípidos, los cuales se localizan en el γ -core. Con la firma descrita para la defensina MtDef4, RGFRRR, en el contexto molecular de J1-1, se pierde el reconocimiento sobre el fosfato 5 del PtdIns (5) P; así como la unión a PtdIns (3,4) P₂ y PtdIns (4,5) P₂, y al PI (3,4,5) P₃. Una posible explicación es que J1-1_DEF4, habría perdido la capacidad de coordinar a los grupos fosfatos en posiciones 3 y 4 en el anillo de inositol de PtdIns (3,4) P₂ y al grupo fosfato en posición 4 en el PtdIns (4,5) P₂ y simultáneamente a los fosfatos en las posiciones 3 y 4 en el PtdIns (3,4,5) P₃. Este panorama sugiere que la unión al fosfato 3, es un tipo de interacción lo

suficientemente estable para la unión a PtdIns (3,5) P₂. Al igual que MtDef4, esta mutante se une preferentemente a PA. No obstante, estudios de determinación estructural, darían un panorama más amplio y exacto de las interacciones de los distintos determinantes y sus ligandos a nivel molecular.

Los lípidos en las membranas bacterianas son constituyentes funcionales y estructurales importantes, y suelen ser blancos para varios tipos de AMPs; los lípidos de membrana, asumen varios roles en la fisiología celular como componentes estructurales o como moléculas de señalización (Carey *et al.*, 2022). En ese contexto, la unión de la mutante J1-1_K45E a PS es relevante debido a su papel descrito en la fisiología celular. PS es un lípido de naturaleza aniónica encontrado en las membranas celulares, bajo condiciones homeostáticas su localización está restringida a la membrana interna de la membrana plasmática, algunos autores han descrito su participación en condiciones tales como: estadio apoptótico, mimetismo apoptótico protista (una condición donde ciertos patógenos exponen PS en la superficie de la membrana para poder translocarse al interior de las células del hospedero para desplegar su virulencia) y la externalización de PS en algunas líneas de cáncer (Calianese y Birge, 2020). En trabajos posteriores, será interesante explorar la actividad de J1-1_K45E sobre células cancerígenas o el efecto que pueda generar sobre patógenos que usen la estrategia del mimetismo apoptótico.

Otra característica importante de las defensinas de plantas para su efecto antimicrobiano está relacionado a la oligomerización en presencia de lípidos, fenómeno que se ha descrito como un evento clave en el mecanismo de acción sobre células antifúngicas (Järvå *et al.*, 2018; Kvensakul *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2015; Poon *et al.*, 2014), en este sentido, la disrupción de la formación de oligómeros está asociada con la reducción de la actividad biológica de las defensinas de plantas (Ochiai *et al.*, 2020; Kvensakul *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2014). Se conoce que bajo concentraciones de sales fisiológicas, la efectividad de los AMPs puede ser afectada a través de la reducción de las interacciones electrostáticas entre los péptidos catiónicos y las superficies aniónicas de las membranas microbianas (Kerenga *et al.*, 2019). La presencia de cationes tales como Na⁺ o K⁺, desestabilizan las interacciones proteína-proteína, lo cual afectaría directamente el proceso de formación de oligómeros. En este trabajo, se realizó un ensayo de entrecruzamiento de J1-1 o J1-1_K45E con el entrecruzante BS³ (incluido en el artículo, sección de anexos), y sus resultados se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con la finalidad de evaluar si la adición de una concentración alta de NaCl afectaba el proceso de oligomerización en presencia o ausencia de PA. Interesantemente, se observaron perfiles de bandas con masas moleculares similares en presencia o ausencia de PA o NaCl para ambos péptidos en los SDS-

PAGE; este resultado sugiere que la mutación de un solo residuo (glutamato por lisina) no afectó la capacidad de J1-1_K45E para formar dímeros y oligómeros, comparado a J1-1 bajo las mismas condiciones de entrecruzamiento. Sin embargo, los resultados de los Western blot indican que hay diferencias en el perfil de proteínas de mayor masa. De acuerdo a observaciones previas basadas en estructuras cristalográficas de defensinas de solanaceae y poaceae, la participación de una red de residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, es suficiente para la formación del dímero y la consiguiente formación del oligómero (Ochiai *et al.*, 2020; Järvå *et al.*, 2017; Poon *et al.*, 2014). Nuestros resultados sugieren que la mutación de K45 por E45, no es suficiente para eliminar la capacidad de J1-1_K45E para formar oligómeros de masa molecular alta. También se observó que el oligómero de J1-1 sin NaCl, tiene un perfil de bandas más débil comparado a las muestras de J1-1 con NaCl, y todas las muestras de J1-1_K45E; este resultado sugiere que la oligomerización de J1-1 en ausencia de NaCl, es más eficiente que la de J1-1_K45E con o sin NaCl y J1-1 con NaCl, desde que bandas correspondiendo a estructuras oligoméricas más estables muestran perfiles de bandas más débiles, indicando la formación de estructuras de mayor masa molecular, de modo similar a lo sugerido en la formación del complejo oligomérico NaD1-PA comparado con el complejo NsD7-PA (Järvå *et al.*, 2017).

Las reacciones de entrecruzamiento también se analizaron por Western blot usando el anticuerpo policlonal anti-J1-1 (artículo en la sección de anexos). La inmunodetección de los péptidos recombinantes mostró perfiles de oligomerización distintos entre J1-1 y J1-1_K45E; J1-1 en presencia o en ausencia de PA formó oligómeros. Asimismo, independientemente de la presencia o ausencia de NaCl en la reacción. El incremento en la señal del anticuerpo, podría estar relacionado con la capacidad de unión de J1-1 a PA observada previamente en ensayos de afinidad a lípidos (Guillén-Chable *et al.*, 2017). Interesantemente, J1-1_K45E formó oligómeros en todas las condiciones probadas con el entrecruzante, aunque los perfiles fueron distintos comparados a los de J1-1. Se observó que la señal del anticuerpo es mayor en bandas de baja masa molecular, y que en las de mayor masa, las señales no están bien definidas. Este resultado sugiere un cambio en los oligómeros de mayor masa molecular. Basados en los perfiles de oligomerización observados, se considera que la mutación en K45 induce alteraciones que afectan el/los sitios de unión a lípidos y a los mecanismos de oligomerización de mayor masa, generando así, un efecto dual de repulsión o unión a los fosfatos en los PIs, así como cambios en las interacciones proteína-proteína. El resultado más sobresaliente de los ensayos de entrecruzamiento es que ya sea J1-1 o J1-1_K45E, son capaces de formar oligómeros

(evidenciado por la reacción de entrecruzamiento) en ausencia de y de manera independiente de la presencia de PA, lo cual no ha sido descrito para otras defensinas de plantas y que podría ser una característica de las defensinas de clase I.

J1-1_K45E presentó actividad antibacteriana sobre dos cepas bacterianas probadas en este estudio (incluido en el artículo, en la sección de anexos). En un trabajo previo, la concentración mínima inhibitoria sobre *P. aeruginosa* de J1-1 fue determinada en 250 µg/mL, además de que no se observó actividad inhibitoria sobre *S. aureus* (Guillén-Chable *et al.*, 2017). En este trabajo, se observó una actividad antibacteriana mejorada sobre *P. aeruginosa*, con una disminución en la concentración de inhibición a 125 µg/mL. Sorpresivamente, esta variante inhibió el crecimiento de *S. aureus* a 250 µg/mL. El cambio de K45 a E45, cambió la carga total de un valor de +4 en J1-1, a +2.1 para J1-1_K45E. El mejoramiento de la actividad antibacteriana de J1-1_K45E sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*, probablemente podría ser influenciada por la carga del péptido, que de acuerdo a varios reportes, sería directamente proporcional a la carga total del péptido, donde la actividad de disrupción de membrana es el principal mecanismo antibacteriano, aunque de acuerdo a nuestros resultados, la actividad parece no ser directamente proporcional a la carga del péptido, por lo que la actividad podría deberse principalmente a la selectividad lipídica y al tipo de membrana celular o incluso al perfil de oligomerización del péptido (Shahmiri *et al.*, 2023). Es importante resaltar que las defensinas de plantas con actividad antibacteriana, en contraste con las que poseen actividad antifúngica, se unen a constituyentes de pared celular, enzimas o ligandos/blancos intracelulares como el ADN y los ribosomas (Bukhteeva *et al.*, 2022; Velivelli *et al.*, 2018). A nuestro conocimiento, este es el primer reporte en el que se mejora la actividad antibacteriana de una defensina de plantas, a través de la reducción de su cationicidad por el cambio de K45 por E en el C-terminal.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- Las secuencias codificantes de las variantes de J1-1 se clonaron en los vectores de expresión y sus productos fueron obtenidos a partir de expresión recombinante en células bacterianas, y su purificación por Ni-NTA y HPLC_{FR}. Particularmente, los péptidos J1-1_KTE y J1-1_DEF4, solo se purificaron por Ni-NTA debido a que las eluciones purificadas mostraron baja concentración de monómeros y dímeros, en contraste a J1-1 y J1-1_K45E que mostraron concentraciones altas.
- Cada variante de J1-1, mostró un patrón distinto de unión a fosfolípidos *in vitro*, aunque todas las variantes reconocieron a PA.
- El cambio de lisina 45 por glutamato en J1-1, no afectó la capacidad de formar oligómeros comparado a J1-1. Interesantemente, la presencia de concentraciones altas de NaCl, no inhibió la formación de oligómeros de J1-1 ni de J1-1_K45E.
- J1-1_K45E, tiene actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, con una MIC de 125 µg/mL que es la mitad de la reportada para J1-1 (250 µg/mL).
- Sorpresivamente, la variante J1-1_K45E presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus*, con una MIC de 250 µg/mL. J1-1, no mostró actividad sobre esta bacteria.
- En este trabajo, se identificaron nuevas determinantes estructurales en J1-1, las cuales participan en el reconocimiento a fosfolípidos, oligomerización y en su actividad antibacteriana.

5.2 Perspectivas

- Evaluar el perfil de expresión de J1-1_KTE y J1-1_DEF4 a partir de cuerpos de inclusión.
- Evaluar la posible síntesis química de los péptidos J1-1_KTE y J1-1_DEF4.
- Caracterizar los perfiles de entrecruzamiento, actividad antibacteriana y hemólisis de J1-1_K45E, J1-1_KTE y J1-1_DEF4.
- Evaluar la actividad lítica de J1-1 y J1-1_K45E sobre células bacterianas.

- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno en células bacterianas en respuesta a J1-1 y J1-1_K45E.
- Evaluar la dinámica de J1-1 y J1-1_K45E en células bacterianas.
- Ampliar el número de ensayos de actividad antimicrobiana incluyendo otras cepas bacterianas y hongos patógenos de humanos y plantas.
- Evaluar la sinergia de los péptidos en presencia de antibióticos de uso convencional.
- Evaluar el efecto antibacteriano de J1-1 y J1-1_K45E *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R., y Abou-El-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 22(1), 29–35.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., y Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(13).
- Al-Delaimy, K. S., y Ali, S. H. (1970). Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(2), 110–112.
- Allen, A., Snyder, A. K., Preuss, M., Nielsen, E. E., Shah, D. M., y Smith, T. J. (2008). Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta*, 227(2).
- Amien, S., Kliwer, I., Márton, M. L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D., y Dresselhaus, T. (2010). Defensin-Like ZmES4 Mediates Pollen Tube Burst in Maize via Opening of the Potassium Channel KZM1. *PLOS Biology*, 8(6), e1000388.
- Aminov, R. I. (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., y Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658.
- Baxter, A. A., Richter, V., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Adda, C. G., Veneer, P. K., Phan, T. K., Bleackley, M. R., Anderson, M. A., Kvensakul, M., y Hulett, M. D. (2015). The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Molecular and Cellular Biology*, 35(11), 1964–1978.

- Bleackley, M. R., Payne, J. A. E., Hayes, B. M. E., Durek, T., Craik, D. J., Shafee, T. M. A., Poon, I. K. H., Hulett, M. D., Weerden, N. L. van der, y Anderson, M. A. (2016). *Nicotiana glauca* Defensin Chimeras Reveal Differences in the Mechanism of Fungal and Tumor Cell Killing and an Enhanced Antifungal Variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6302.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., y Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, 108(4), 1353–1358.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250.
- Bruix, M., González, C., Santoro, J., Soriano, F., Rocher, A., Méndez, E., y Rico, M. (1995). ¹H-nmr studies on the structure of a new thionin from barley endosperm. *Biopolymers*, 36(6), 751–763.
- Bukhteeva, I., Hrunyk, N. I., Yusypovych, Y. M., Shalovylo, Y. I., Kovaleva, V., y Nesmelova, I. V. (2022). Structure, dynamics, and function of PsDef2 defensin from *Pinus sylvestris*. *Structure (London, England: 1993)*, 30(5), 753-762.e5.
- Bushnell, O. A., Bushnell, O. A., Fukuda, M., y Makinodan, T. (1950). The Antibacterial Properties of Some Plants Found in Hawaii. *Pacific Science*, 4(3), 167--183.
- Caceres, A., Alvarez, A. V., Ovando, A. E., y Samayoa, B. E. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(2), 193–208.

- Calianese, D. C., y Birge, R. B. (2020). Biology of phosphatidylserine (PS): Basic physiology and implications in immunology, infectious disease, and cancer. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 18(1), 41.
- Carey, A. B., Ashenden, A., y Köper, I. (2022). Model architectures for bacterial membranes. *Biophysical Reviews*, 14(1), 111–143.
- Carratalá, J. V., Serna, N., Villaverde, A., Vázquez, E., y Ferrer-Miralles, N. (2020). Nanostructured antimicrobial peptides: The last push towards clinics. *Biotechnology Advances*, 44, 107603.
- Carvalho, A. de O., y Gomes, V. M. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. *Peptides*, 28(5), 1144–1153.
- Carvalho, A. de O., y Gomes, V. M. (2009). Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007–1020.
- Cassilly, C. D., y Reynolds, T. B. (2018). PS, It's Complicated: The Roles of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the Pathogenesis of *Candida albicans* and Other Microbial Pathogens. *Journal of Fungi*, 4(1), Article 1.
- Chen, G.-H., Hsu, M.-P., Tan, C.-H., Sung, H.-Y., Kuo, C. G., Fan, M.-J., Chen, H.-M., Chen, S., y Chen, C.-S. (2005). Cloning and Characterization of a Plant Defensin VaD1 from Azuki Bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 982–988.
- Chen, J.-J., Chen, G.-H., Hsu, H.-C., Li, S.-S., y 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.
- Cichewicz, R. H., y Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 61–70.
- Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P., y Thevissen, K. (2017). Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*, 12, 441–454.

- Cox, P. A. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations. *Ciba Foundation Symposium*, 185, 25–36; discussion 36-41.
- da Silva Gebara, R., Taveira, G. B., de Azevedo Dos Santos, L., Calixto, S. D., Simão, T. L. B. V., Lassounskaia, E., Muzitano, M. F., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Rodrigues, R., de Oliveira Carvalho, A., y Gomes, V. M. (2020). Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1253–1265.
- de Beer, A., y Vivier, M. A. (2011). Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes*, 4(1), 459.
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., y Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 10.1128/cmr.00181-19.
- El-Mounadi, K., Islam, K. T., Hernández-Ortiz, P., Read, N. D., y Shah, D. M. (2016). Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, 100(3), 542–559.
- Erdem Büyükkiraz, M., y Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573–1596.
- Etebu, E., y Ariekpar, I. (2016). *Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives*.
- Expasy—ProtParam tool. (2024). Retrieved February 27, 2024, from <https://web.expasy.org/protparam/>.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., y Grossi-De-Sá, M. F. (2002). Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. *European Journal of Biochemistry*, 269(2), 397–412.

- Gottshall, R. Y., y Lucas, E. H. (1949). The occurrence of antibacterial substances active against *Mycobacterium tuberculosis* in seed plants. *The Journal of Clinical Investigation*, 28(5 Pt 1), 920–923.
- Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., y Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic *in vivo* toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(1), 13206.
- Guillén-Chable, F., Arenas-Sosa, I., Islas-Flores, I., Corzo, G., Martínez-Liu, C., y Estrada, G. (2017). Antibacterial activity and phospholipid recognition of the recombinant defensin J1-1 from *Capsicum* genus. *Protein Expression and Purification*, 136, 45–51.
- Guillén-Chablé, F., y Estrada, G. (2017). Structural Motifs in Class I and Class II Plant Defensins for Phospholipid Interactions: Intriguing Role of Ligand Binding and Modes of Action. *Journal of Plant Physiology y Pathology*, 2017.
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Anderson, M. A., y van der Weerden, N. L. (2018). The Plant Defensin NaD1 Enters the Cytoplasm of *Candida Albicans* via Endocytosis. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 4(1), 20.
- Hein, M. J. A., Kvensakul, M., Lay, F. T., Phan, T. K., y Hulett, M. D. (2022). Defensin-lipid interactions in membrane targeting: Mechanisms of action and opportunities for the development of antimicrobial and anticancer therapeutics. *Biochemical Society Transactions*, 50(1), 423–437.
- Heukeshoven, J., Dernick R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6(3), 103-112.
- Huang, G.-J., Lai, H.-C., Chang, Y.-S., Sheu, M.-J., Lu, T.-L., Huang, S.-S., y Lin, Y.-H. (2008). Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 'Tainong 57'] storage roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2989–2995.

- Idris, F. N., y Nadzir, M. M. (2023). Multi-drug resistant ESKAPE pathogens and the uses of plants as their antimicrobial agents. *Archives of Microbiology*, 205(4), 115.
- Ishaq, N., Bilal, M., y Iqbal, H. M. N. (2019). Medicinal Potentialities of Plant Defensins: A Review with Applied Perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 6(1), 29.
- Islam, K. T., Velivelli, S. L. S., Berg, R. H., Oakley, B., y Shah, D. M. (2017). A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
- Järvå, M., Lay, F. T., Hulett, M. D., y Kvansakul, M. (2017). Structure of the defensin NsD7 in complex with PIP2 reveals that defensin: Lipid oligomer topologies are dependent on lipid type. *FEBS Letters*, 591(16), 2482–2490.
- Järvå, M., Lay, F. T., Phan, T. K., Humble, C., Poon, I. K. H., Bleackley, M. R., Anderson, M. A., Hulett, M. D., y Kvansakul, M. (2018). X-ray structure of a carpet-like antimicrobial defensin-phospholipid membrane disruption complex. *Nature Communications*, 9(1), 1962.
- Jones, J. D. G., y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), Article 7117.
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., y Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6316), aaf6395.
- Kaewklom, S., Wongchai, M., Petvises, S., Hanpithakphong, W., y Aunpad, R. (2018). Structural and biological features of a novel plant defensin from *Brugmansia x candida*. *PLOS ONE*, 13(8), e0201668.
- Kerenga, B. K., McKenna, J. A., Harvey, P. J., Quimbar, P., Garcia-Ceron, D., Lay, F. T., Phan, T. K., Veneer, P. K., Vasa, S., Parisi, K., Shafee, T. M. A., van der Weerden, N. L., Hulett, M. D., Craik, D. J., Anderson, M. A., y Bleackley, M. R. (2019). Salt-Tolerant Antifungal and Antibacterial Activities of the Corn Defensin ZmD32. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., y Nesmelova, I. V. (2020). Plant Defensins from a Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5307.

- Kushmerick, C., de Souza Castro, M., Santos Cruz, J., Bloch, C., y Beirão, P. S. (1998). Functional and structural features of gamma-zeathionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Letters*, 440(3), 302–306.
- Kvansakul, M., Lay, F. T., Adda, C. G., Veneer, P. K., Baxter, A. A., Phan, T. K., Poon, I. K. H., y Hulett, M. D. (2016). Binding of phosphatidic acid by NsD7 mediates the formation of helical defensin-lipid oligomeric assemblies and membrane permeabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11202–11207.
- Lacerda, A., Vasconcelos, É., PELEGRINI, P., y Grossi-de-Sa, M. F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Lay, F. T., Mills, G. D., Poon, I. K. H., Cowieson, N. P., Kirby, N., Baxter, A. A., van der Weerden, N. L., Dogovski, C., Perugini, M. A., Anderson, M. A., Kvansakul, M., y Hulett, M. D. (2012). Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19961–19972.
- Lay, F. T., Ryan, G. F., Caria, S., Phan, T. K., Veneer, P. K., White, J. A., Kvansakul, M., y Hulett, M. D. (2019). Structural and functional characterization of the membrane-permeabilizing activity of *Nicotiana occidentalis* defensin NoD173 and protein engineering to enhance oncolysis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(5), 6470–6482.
- Lee, H.-H., Kim, J.-S., Hoang, Q. T. N., Kim, J.-I., y Kim, Y. S. (2018). Root-specific expression of defensin in transgenic tobacco results in enhanced resistance against *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3), 811–823.
- Letousey, P., De Zélicourt, A., Vieira Dos Santos, C., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P., y Delavault, P. (2007). Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology*, 56(3), 536–546.

- Li, H., Velivelli, S. L. S., y Shah, D. M. (2019). Antifungal Potency and Modes of Action of a Novel Olive Tree Defensin Against Closely Related Ascomycete Fungal Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 32(12), 1649–1664.
- Lin, P., Wong, J. H., y Ng, T. B. (2009). A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. *Bioscience Reports*, 30(2), 101–109.
- Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R., y Kurtenbach, E. (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, 46(4), 987–996.
- Loewith, R., Riezman, H., y Winssinger, N. (2019). Sphingolipids and membrane targets for therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 50, 19–28.
- Lucas, E. H., Lickfeldt, A., Gottshall, R. Y., y Jennings, J. C. (1951). The Occurrence of Antibacterial Substances in Seed Plants with Special Reference to *Mycobacterium tuberculosis*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 78(4), 310–321.
- MacDonald, R. E., y Bishop, C. J. (1953). A further survey of plants for antibacterial substances. *Canadian Journal of Botany*, 31(1), 123–131.
- Mahmood, T., y Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., y Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 178.
- Maurya, A. K. (2020). Application of Plant Volatile Organic Compounds (VOCs) in Agriculture. In A. Rakshit, H. B. Singh, A. K. Singh, U. S. Singh, y L. Fraceto (Eds.), *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture* (pp. 369–388).
- Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi de Sá, M. F., y Bloch, C. (2002). Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins*, 48(2), 311–319.

- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., y de Haro, C. (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, 194(2), 533–539.
- Meyer, B., Houlne, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M. L., y Schantz, R. (1996). Fruit-Specific Expression of a Defensin-Type Gene Family in Bell Pepper (Upregulation during Ripening and upon Wounding). *Plant Physiology*, 112(2), 615–622.
- Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., Lebrun, M., Berthomieu, P., y Marquès, L. (2006). A putative novel role for plant defensins: A defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 47(3), 329–342.
- Mitscher, L. A., Park, Y. H., Clark, D., y Beal, J. L. (1980). Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Typica*. *Journal of Natural Products*, 43(2), 259–269.
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A., y Falabella, P. (2021). Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 668632.
- Mosolov, V. V., y Valueva, T. A. (2008). Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 44(3), 261–269.
- Moyer, T. B., Purvis, A. L., Wommack, A. J., y Hicks, L. M. (2021). Proteomic response of *Escherichia coli* to a membrane lytic and iron chelating truncated *Amaranthus tricolor* defensin. *BMC Microbiology*, 21(1), 110.
- Nguyen, Q.-M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., y Kim, S. H. (2021). Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), Article 9.

- Nikolic, P., y Mudgil, P. (2023). The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 11(2), 259.
- Nikoloudakis, N., Pappi, P., Markakis, E. A., Charova, S. N., Fanourakis, D., Paschalidis, K., Delis, C., Tzortzakakis, E. A., y Tsaniklidis, G. (2020). Structural Diversity and Highly Specific Host-Pathogen Transcriptional Regulation of Defensin Genes Is Revealed in Tomato. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9380.
- Nikte, S., Gahankari, A., Mulla, J., Sengupta, D., Joshi, M., y Tamhane, V. (2020). *In vitro* and *in silico* studies on membrane interactions of diverse *Capsicum annuum* flower γ -thionin peptides. *Proteins*, 88(1), 227–236.
- Ochiai, A., Ogawa, K., Fukuda, M., Suzuki, M., Ito, K., Tanaka, T., Sagehashi, Y., y Taniguchi, M. (2020). Crystal structure of rice defensin OsAFP1 and molecular insight into lipid-binding. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(1), 6–13.
- Pacheco-Cano, R. D., Salcedo-Hernández, R., Casados-Vázquez, L. E., Wrobel, K., Bideshi, D. K., y Barboza-Corona, J. E. (2020). Class I defensins (BraDef) from broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) seeds and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 36(2), 30.
- Pan, J., Hu, C., y Yu, J.-H. (2018). Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. *Journal of Fungi*, 4(2), 50.
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., y Anderson, M. A. (2018). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 88, 107–118.
- Pelegri, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A., y Franco, O. L. (2008). Novel insights on the mechanism of action of alpha-amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins*, 73(3), 719–729.

- Penecilla, G. L., y Magno, C. P. (2011). *Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines*.
- Peptide y Amino Acids Calculator | Bachem. (2024). Retrieved February 27, 2024, from <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>.
- Phan, T. K., Bindra, G. K., Williams, S. A., Poon, I. K. H., y Hulett, M. D. (2019). Combating Human Pathogens and Cancer by Targeting Phosphoinositides and Their Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(11), 866–882.
- Phan, T. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Hinds, M. G., Kvensakul, M., y Hulett, M. D. (2016). Human β -defensin 3 contains an oncolytic motif that binds PI(4,5)P2 to mediate tumour cell permeabilisation. *Oncotarget*, 7(2), 2054–2069.
- Pinheiro-Aguiar, R., do Amaral, V. S. G., Pereira, I. B., Kurtenbach, E., y Almeida, F. C. L. (2020). Nuclear magnetic resonance solution structure of *Pisum sativum* defensin 2 provides evidence for the presence of hydrophobic surface-clusters. *Proteins*, 88(1), 242–246.
- Poon, I. K., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. A., Phan, T. K., Ryan, G. F., White, J. A., Veneer, P. K., van der Weerden, N. L., Anderson, M. A., Kvensakul, M., y Hulett, M. D. (2014). Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *eLife*, 3, e01808.
- Pothana, A., Bhatnagar-Mathur, P., Yeshvekar, R. K., y Sharma, K. K. (2019). Plant Defensins: Tissue Specific Expression Leading to Distinctive Functions. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 13(2), Article 2.
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., y Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, 2013, 675391.
- Radhajeyalakshmi, R., Xia, Y., y Shah, D. (2020). Antifungal Defensins In Controlling Panama Wilt of Banana *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Annals of Biological Sciences*, 8(2).

- Ramada, M. H. S., Brand, G. D., Abrão, F. Y., Oliveira, M., Filho, J. L. C., Galbieri, R., Gramacho, K. P., Prates, M. V., y Bloch, C. (2017). Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
- Ramírez-Meraz, M., Méndez-Aguilar, R., Zepeda-Vallejo, L. G., Hernández-Guerrero, C. J., Hidalgo-Martínez, D., y Becerra-Martínez, E. (2024). Exploring the chemical diversity of *Capsicum chinense* cultivars using NMR-based metabolomics and machine learning methods. *Food Research International*, 178, 113796.
- Rocha, A. J., Barsottini, M. R. de O., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., Moraes, F. L. L. de, y Rocha, S. L. da. (2019). *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19180503.
- Rodriguez, A., Pedersen, M. Ø., Villegas, E., Rivas-Santiago, B., Villegas-Moreno, J., Amero, C., Norton, R. S., y Corzo, G. (2020). Antimicrobial activity and structure of a consensus human β -defensin and its comparison to a novel putative hBD10. *Proteins*, 88(1), 175–186.
- Rodríguez-Decuadro, S., Dans, P. D., Borba, M. A., Benko-Iseppon, A. M., y Cecchetto, G. (2019). Gene isolation and structural characterization of a legume tree defensin with a broad spectrum of antimicrobial activity. *Planta*, 250(5), 1757–1772.
- Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko, G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi, R. S., Smith, T. J., y Shah, D. M. (2013). Structural and Functional Studies of a Phosphatidic Acid-Binding Antifungal Plant Defensin MtDef4: Identification of an RGFRRR Motif Governing Fungal Cell Entry. *PLoS ONE*, 8(12), e82485.
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., y Shah, D. M. (2011). Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PloS One*, 6(4), e18550.

- Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramírez-Sotelo, G., y Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Research International*, 2015, 102129.
- Sathoff, A. E., Lewenza, S., y Samac, D. A. (2020). Plant defensin antibacterial mode of action against *Pseudomonas* species. *BMC Microbiology*, 20(1), 173.
- Sathoff, A. E., Velivelli, S., Shah, D. M., y Samac, D. A. (2019). Plant Defensin Peptides have Antifungal and Antibacterial Activity Against Human and Plant Pathogens. *Phytopathology*, 109(3), 402–408.
- Scilletta, N. A., Pezzoni, M., Desimone, M. F., Soler-Illia, G. J. A. A., Bellino, M. G., y Catalano, P. N. (2021). Determination of Antibacterial Activity of Film Coatings Against Four Clinically Relevant Bacterial Strains. *Bio-Protocol*, 11(2), e3887.
- Seo, H.-H., Park, S., Park, S., Oh, B.-J., Back, K., Han, O., Kim, J.-I., y Kim, Y. S. (2014). Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. *PLoS One*, 9(5), e97936.
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., y Anderson, M. A. (2016). The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, 33(9), 2345–2356.
- Shahmiri, M., Bleackley, M. R., Dawson, C. S., van der Weerden, N. L., Anderson, M. A., y Mechler, A. (2023). Membrane binding properties of plant defensins. *Phytochemistry*, 209, 113618.
- Sher Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M., y Mii, M. (2019). Plant defensins: Types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, 9(5), 192.
- Slezina, M. P., Istomina, E. A., Kulakovskaya, E. V., Abashina, T. N., y Odintsova, T. I. (2021). Synthetic Oligopeptides Mimicking γ -Core Regions of Cysteine-Rich Peptides of *Solanum*

- lycopersicum* Possess Antimicrobial Activity against Human and Plant Pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3), 1226–1242.
- Soetarno, S., Sukrasno, S., Yulinah, E., y Sylvia, S. (1997). Antimicrobial Activities of the Ethanol Extracts of Capsicum Fruits with Different Levels of Pungency. *Jurnal Matematika Dan Sains*, 2(2), Article 2.
- Solis, J., Medrano, G., y Ghislain, M. (2007). Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 164(8), 1071–1082.
- Spelbrink, R. G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T. J., Shah, D. M., y Hockerman, G. H. (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiology*, 135(4), 2055–2067.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., y Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711–757.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., y Vanderleyden, J. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573–588.
- Terras, F. R., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., y Broekaert, W. F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, 316(3), 233–240.

- Toledo, E. B., Lucas, D. R., Simão, T. L. B. V., Calixto, S. D., Lassounskaia, E., Muzitano, M. F., Damica, F. Z., Gomes, V. M., y de Oliveira Carvalho, A. (2021). Design of improved synthetic antifungal peptides with targeted variations in charge, hydrophobicity and chirality based on a correlation study between biological activity and primary structure of plant defensin γ -cores. *Amino Acids*, 53(2), 219–237.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., y Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
- van der Weerden, N. L., y Anderson, M. A. (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 121–131.
- Velivelli, S. L. S., Islam, K. T., Hobson, E., y Shah, D. M. (2018). Modes of Action of a Bi-domain Plant Defensin MtDef5 Against a Bacterial Pathogen *Xanthomonas campestris*. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Vriens, K., Peigneur, S., De Coninck, B., Tytgat, J., Cammue, B. P. A., y Thevissen, K. (2016). The antifungal plant defensin AtPDF2.3 from *Arabidopsis thaliana* blocks potassium channels. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1.
- Weerden, N. L. van der, Hancock, R. E. W., y Anderson, M. A. (2010). Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37513.
- Wei, H., Movahedi, A., Xu, C., Sun, W., Li, L., Li, D., y Zhuge, Q. (2019). Characterization, expression profiling, and functional analysis of a *Populus trichocarpa* defensin gene and its potential as an anti-*Agrobacterium* rooting medium additive. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1.
- Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Artlip, T. S., Webb, R. P., Janisiewicz, W. J., Norelli, J. L., Goldway, M., y Droby, S. (2003). Characterization of a defensin in bark and fruit tissues

- of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 563–572.
- Wong, J. H., y Ng, T. B. (2006). Limenin, a defensin-like peptide with multiple exploitable activities from shelf beans. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 12(5), 341–346.
- Woolley, D. W., y Krampitz, L. O. (1942). Reversal by phosphatides of the antimicrobial action of a crystalline protein from wheat. *Journal of Biological Chemistry*, 146(1), 273–274.
- Woytowich, A. E., y Khachatourians, G. G. (2001). Plant antifungal peptides and their use in transgenic food crops. In G. G. Khachatourians y D. K. Arora (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 1, pp. 145–164). Elsevier.
- Wyatt, C. (2019). Resistant Organisms and Their Approach to Management in Clinical and Emergency Care. *Current Emergency and Hospital Medicine Reports*, 7(3), 59–65.
- Xu, D., y Lu, W. (2020). Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Ye, X. Y., y Ng, T. B. (2002). A new antifungal peptide from rice beans. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society*, 60(2), 81–87.
- Zhou, H., Huo, Y., Yang, N., y Wei, T. (2023). Phosphatidic acid: From biophysical properties to diverse functions. *The FEBS Journal*.

ANEXO

Antibacterial Activity Improvement in a Point Mutant K45E of the Pepper Defensin J1-1

Abstract

Plant defensins have attracted attention to develop new antimicrobials. Yet the elucidation of their modes of action against bacterial pathogens is still incipient. The available recombinant systems to obtain plant defensin mutants with enhanced or optimized antibacterial activity may help to accelerate the knowledge of their action mechanisms and their applications against pathogens. In this work, the point mutant defensin K45E (J1-1_K45E) was obtained by the same recombinant system as J1-1 defensin. The characterized peptide conserved antibacterial activity against the Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and showed a dose improvement relative to J1-1. Furthermore, the mutant J1-1_K45E exhibited a gain in function against the Gram-positive *Staphylococcus aureus*. Finally, to correlate structural changes and antibacterial activity, two properties involved in defensins modes of action were measured, first the mutant J1-1_K45E oligomerize in a distinct pattern compared with J1-1 and second, J1-1_K45E has preference for phosphatidylserine among other cell membrane phospholipids. Together, our findings support the idea that amino acid sequence variability in plant defensins superfamily can generate major functional changes, and highlights the relevant role of charged residues, beyond the γ -core loop, in the improvement of J1-1 antibacterial activity.

Highlights

- **Recombinantly expressed point mutant J1-1K45E is active against *Pseudomonas aeruginosa*.**
- **This is the first report for an antibacterial plant defensin activity improvement by reducing defensin positive charge.**
- **J1-1_K45E is active against *Staphylococcus aureus*.**
- **Defensin activity improvement might be related to changes in oligomerization or lipid selectivity in J1-1K45E.**

Key words

Antibacterial defensin, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, Peptide-Lipid interactions, Polyclonal antibodies.

Introduction

Among multiple sets of molecules produced by plants, plant defensins show antimicrobial activities against human, animal and plant pathogens (Pacheco-Cano *et al.* 2020; Sathoff *et al.* 2020).

According to their subcellular localization, plant defensins are classified as class I or class II. Class I contains a signal peptide and the mature domain, while class II defensins, in addition to the signal peptide and the mature sequence, bear a carboxy-terminal propeptide (Velivelli *et al.* 2018). In nature, these peptides contribute to plant immunity and are induced in response to pathogen attack (Aerts *et al.* 2008; Carvalho and Gomes, 2009). Plant defensins are short, cationic, cysteine-rich peptides that fold into the CS $\alpha\beta$ 3D structure, which consists of a triple-stranded antiparallel β -sheet and one α -helix stabilized by four disulfides (Lacerda *et al.* 2014).

Class II plant defensins form phospholipid stabilized dimers, considered oligomerization inducers, dimer stabilization and oligomerization are lipid concentration dependent processes, that might be critical to exert their antimicrobial activity (Kvansakul *et al.* 2016).

Structure-guided mutant peptides have been designed to explore the importance of structural determinants and to find correlations with defensin antifungal activity. Plant defensins interactions with sphingolipids and phospholipids have defined known MOA, with multiple and varied cellular events as part of fungal cells killing. For example, the internalization of MtDef4, from *Medicago truncatula*, depends on the presence of the PA to exert its antifungal activity on *Fusarium graminearum* and *Neurospora crassa*. Additionally, GluCer is required for RsAFP2 to induce apoptosis, cell wall stress, reactive oxygen species and septin mislocalization in *Candida albicans* (Cools *et al.* 2017).

Recently, several class II defensins in complex with phospholipids have been crystalized and their oligomeric structures are available. These defensin-lipid oligomeric structures have allowed the analysis of precise molecular interactions namely, protein-lipid interactions and protein-protein interactions in defensin dimers and oligomer interfaces (Poon *et al.* 2014; Kvansakul *et al.* 2016; Järvå *et al.* 2017; Ochiai *et al.* 2020).

Binding to phospholipids involve cationic residues in the interface, for example in *Nicotiana alata* defensin NaD1, the mutant R40E showed reduced binding and oligomerization with PI (4) P compared to the WT. Moreover, the mutant exhibited reduced activity on *Fusarium oxysporum*, in NaD1, R40 is involved in PI (4,5) P2 binding through a network of hydrogen bonds with N-terminus and the γ -core residues (Poon *et al.* 2014).

Additionally, two-mutant peptides, K36E and R39A from NaD1, coordinate the phosphate head group of PA as observed in NaD1-PA complex; the mutant R39A was unable to form oligomers in the presence of PA. Regarding their antifungal activity against *Candida albicans*, both peptides showed higher IC₅₀ values (2.5±0.1 μ M for K36E and 4.5±0.1 μ M for R39A) compared to WT NaD1 (1.9±0.2 μ M) (Järvå *et al.* 2018).

The *Solanum lycopersicum* defensin TPP3 and OsAFP1, from *Oryza sativa*, share a similar dimer arrangement as the observed in the *Nicotiana suaveolens* defensin NsD7 in complex with PA, where the conserved residues that participate in the dimer interface are numbered K47 and C49; in the dimer-dimer interface of OsAFP1 K47 coordinates a phosphate ion, because this structure was obtained in the absence of phospholipids (Baxter *et al.* 2015; Ochiai *et al.* 2020).

Finally, two TPP3 variants, K6A and K42E, were designed to compare interactions previously described for K4 and R40 residues in NaD1. Both variants were unable to form high-order oligomers in the presence of PI (4,5) P2, both lost binding to PI (4,5) P2 on lipid strips, and a 3-fold reduction in *Fusarium graminearum* hyphal growth inhibition was observed when compared to WT TPP3 (Baxter *et al.* 2015).

Plant antibacterial defensins have the potential to be applied against antibiotic-resistant bacteria, however, a lack of knowledge regarding their MOA delays their use as antibacterial agents (Ishaq *et al.* 2019). In 2016, the World Health Organization (WHO) was requested by member states to create a priority list of antibiotic-resistant bacteria to support research and development of effective drugs (Tacconelli *et al.* 2018). Among that list, ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species) were included. These ESKAPE pathogens are associated with high rates of mortality, diseases, and economic burden in healthcare worldwide (Idris and Nadzir, 2023). The pepper defensin J1-1 was previously obtained in a bacterial expression system in *Escherichia coli*. Recombinant J1-1 is an antibacterial PA binding peptide, active on Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* (Guillén-Chable *et al.* 2017).

Here, we report the functional characterization of the point mutant J1-1_K45E derived from the type I antibacterial defensin J1-1. This point mutant showed a Lipid-independent oligomerization, a distinct lipid-binding specificity, and an improved antibacterial activity. Compared to J1-1, J1-1_K45E improved its antibacterial activity against the human and animal pathogen *P. aeruginosa*, consisted in a reduced quantity of peptide needed to inhibit bacterial growth, interestingly it exhibited activity against *Staphylococcus aureus*. J1-1_K45E also binds to PA, but acquired the capacity to bind to phosphatidylserine (PS) *in vitro*. Yet, J1-1_K45E exhibited differences in its oligomerization pattern compared to J1-1, but neither J1-1 nor J1-1_K45E oligomerize in a PA concentration dependent manner.

Materials and Methods

3D-structure model of Dimers

The 3D structural model of J1-1 mature peptide as monomer was obtained by homology modeling in Modeller software using the PDB ID 2LR3 (*Medicago truncatula* defensin, MtDef4) as a template. The 3D models of dimers were generated using PDB file 5KK4 (NaD1 defensin) as template and the molecular surface electrostatic potential of both J1-1

and J1-1_K45E mature peptides, were obtained by PyMOL using the software default settings.

Physicochemical characteristics such as molecular weight, isoelectric point, total charge and GRAVY index score of both peptide sequences J1-1 and J1-1_K45E were *in silico* predicted by using ProtParam (*ExPASy - ProtParam Tool*) and Peptide Calculator (*Peptide & Amino Acids Calculator, Bachem, n.d.*).

Bacterial strains, enzymes and plasmids.

E. coli DH5 α and *E. coli* Origami (DE3) strains were used for plasmid propagation and recombinant protein expression, respectively. pGEM-TEasy (Promega Biotech, United States) and pQE30 (QIAGEN) plasmids were the cloning and expression vector, respectively, for the J1-1_K45E gene. Bacterial pathogenic strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were purchased from the American Type Culture Collection through The Global Bioresource Center™.

Expression and purification of J1-1_K45E.

A mutant gene of the previously reported J1-1 from *Capsicum chinense* Jacq was obtained by PCR using as template the *Capsicum chinense* Jacq genomic DNA and specific primers. A reverse primer was designed to introduce a point mutation in the K45E in J1-1 mature peptide sequence. The reverse primer sequence is 5'GCT AAT TAA GCT TGG CTG CAG TTA AGC ACA GGG CTC 3'. J1-1_K45E gene cloning was performed by introducing *Bam* *HI* and *Pst* *I* sites at 5' and 3', respectively. The obtained plasmid construct in the expression vector pQE30 or pQE30_J1-1_K45E (Guillén-Chable *et al.* 2017) was confirmed by sequencing. The recombinant expression and purification of recombinantly expressed J1-1_K45E, was performed by affinity chromatography using Ni-NTA in denaturant conditions (Qiagen) and rpHPLC. Briefly, a semi-preparative C₁₈ column (5C₁₈MS, 10 x 250 mm Nacalai-Tesque Japan) was run from solvent A (0.1 and trifluoroacetic acid -TFA- in water) to solvent B (0.1 and TFA in ACN) using a gradient that started after 10 minutes from 10 to 100 % of solvent B in 30 minutes at flow of 1.5

mL min⁻¹. After collecting manually J1-1_K45E, it was vacuum dried and solubilized in sterile H₂O. Pure J1-1_K45E and J1-1 were used for the protein-lipid interaction assay, protein cross-linking and antibacterial activity assays.

Peptide analysis by SDS-PAGE and Western Blot

Both J1-1_K45E and J1-1 were visualized by SDS-PAGE under reducing and denaturant conditions. The polyacrylamide gels were stained with Coomassie R250 Brilliant Blue solution for 30 min. The destaining solution was a mixture of acetic acid and methanol. The molecular mass markers used for SDS-PAGE and Western blot were from either Sigma (Color Markers Wide Range, Sigma-Aldrich Cat.3437; Broad-Range SDS-PAGE Standards Sigma-Aldrich Cat.1610317) or Thermo (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™).

To observe differences in the cross-linking profile of the recombinant peptides, identical samples were used in standard SDS-PAGE and WB (Mahmood and Yang, 2012), the protein detection was performed using polyclonal rabbit antibodies anti-J1-1 previously obtained (Guillen-Chablé, *et al.* 2017). After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF (Polyvinylidene fluoride, Immobilon®-P Millipore) membranes. Immunodetection of oligomeric complexes of both peptides were performed by using polyclonal antibodies anti-J1-1 (1:10,000 dilution) and then anti-rabbit HRP-coupled-IgG was used as secondary antibody (Sigma-Aldrich Cat. 32160702) chemiluminescence detection and images acquisition were obtained in a ChemiDoc™MP Imaging System BIO-RAD

Protein cross-linking

Cross-linking reactions were conducted in a volume of 50 µL containing 1 mg/mL of J1-1 or J1-1_K45E, 5 mM bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS³), (Islam *et al.* 2017). In modified conditions defensins were incubated in the presence or absence of 447.8 µM PA and 150 mM of NaCl in water, at room temperature. After 30 min of incubation, 5 µL Tris 500 mM was used to stop the reaction. Protein samples were visualized using 12 µL of the protein cross-linking reactions, boiled for 5 min at 95°C in reducing and denaturing

conditions and loaded into SDS-PAGE lanes and ran at 120 V (Mini PROTEAN tetra Cell chamber BioRad TM). Proteins were stained with Coomassie blue or transferred to PVDF membranes for *Western Blot* analysis.

Antibacterial activity

The bacterial strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, were cultured with J1-1_K45E in broth microdilution assay as previously described in (Guillén-Chable *et al.* 2017) with some modifications. Briefly modifications consisted in the use of ½ Mueller-Hinton broth (MHB) (BD Biosciences, Sparks, Md.) instead of MH medium. It was performed as consequence of the observed aggregation in solution at peptide concentrations of 125 µg/mL and 250 µg/mL in MHB. The peptide J1-1_K45E was diluted in sterile ½ MHB in 96-well microtiter Costar® culture plates (Sigma-Aldrich) to a final volume of 100 µL, *i.e.*, 50 µL of bacterium in ½ MHB and 50 µL of the recombinant peptide in sterile water containing the corresponding peptide concentration. The bacterial strains were initially cultured in ½ MHB to reach values between 0.08 and 0.1 absorbance units at 600 nm then, cultures were diluted 1:100 with sterile ½ MHB. 50 µL of these dilutions were dispensed into each plate well, and immediately added 50 µL of two-fold final concentration of the peptide J1-1_K45E solution to reach a final volume of 100 µL per well. Culture plates were incubated at 37 °C for 18 hours. Absorbance at 600 nm was measured using a SunriseTM plate reader Tecan Group Ltd. (San Jose, CA, USA). Experiments were conducted with gentamicin as control and without antibiotic to calculate maximum growth, replicates are n=4. Next, CFU assays were performed as follows, a volume of 10 µL from overnight microdilution cultures at peptide concentrations: 250, 125, 62.5, 31.25 and 15.62 µg/mL, as well as the positive or negative control were taken and serially diluted (6-fold). Finally, 15 µL of each dilution was plated onto ½ MH-agar and incubated for 18 h at 37°C (n=2). To obtain the bacterial inhibition percentages, CFU for *P. aeruginosa* and *S. aureus* were calculated according to the formula $CFU = \frac{\text{Number of colonies} \times \text{Dilution factor}}{\text{Plated volume in mL}}$ (Scilletta *et al.* 2021).

Peptide-lipid Binding

In vitro peptide-lipid interactions were analyzed according to Poon *et al.* (2014). Briefly, J1-1_K45E lipid interactions using P-6001 PIP strips (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT) were used together with HRP-coupled anti-rabbit antibodies as secondary antibodies (Sigma-Aldrich 32160702, diluted 1:10,000). The membrane was incubated for 20 min, and after two washing steps with 5 mL of TBS-T, treated with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Co.) following the manufacturer's instructions. Peptide-lipid binding was detected by chemiluminescence and documented in a ChemiDoc™MP Imaging System (BIORAD).

Results

Cloning of J1-1_K45E gene into the pQE30 expression plasmid

The vector pQE30 was used to express the *Capsicum chinense* defensin mutant gene *J1-1_K45E* in *E. coli* Origami (DE3) strain. The expression vector contains a T5 promoter to be induced by IPTG which is added to the culture medium for protein expression. The expressed recombinant defensin bear an N-terminal 6xHis tag to facilitate the purification by affinity chromatography, followed for a sequence that encodes the amino acids IEGR that serve as a cut site for Factor Xa protease to release, if necessary, the J1-1_K45E mature peptide from the 6xHis-tag. The correct reading frame and restriction sites in the new pQE30J1-1_K45E plasmid were confirmed. Figure 1A shows the 3D structure model of the monomeric defensin J1-1 and the putative PA and PIP2 binding residues. Figure 1B shows the J1-1_K45E fusion protein format and its amino acid sequence, and figure 3C shows theoretical biophysical values of J1-1 and J1-1_K45E.

to dimers and trimers were observed. Also, other multimeric forms with larger molecular mass were visible (Figure 2).

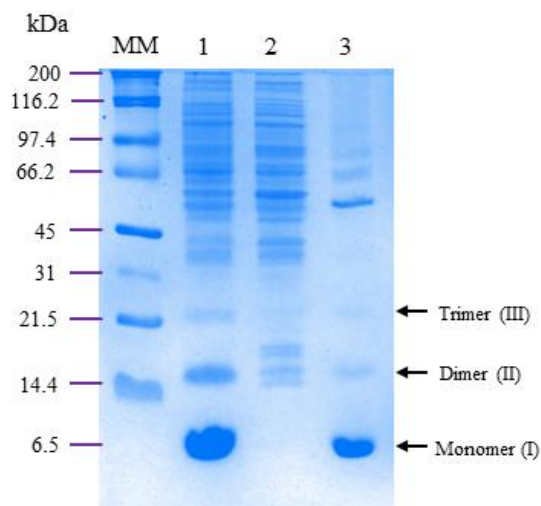


Figure 2. Affinity Chromatography Purification of the recombinant J1-1_K45E. MM), molecular weight marker; 1), GdnHCl solubilized inclusion bodies; 2), flow-through; 3), recombinant protein elution with imidazole 0.7 M. Black arrows and roman numbers indicates the monomers, dimers and trimers.

After nickel affinity chromatography purification, main fractions were injected into C₁₈ column for a rpHPLC purification. The resulting chromatogram of this purification is shown in Figure 3. Mass spectrometric analysis of J1-1_K45E, collected at retention time (RT) of 26.6 min, showed a molecular mass of 7,044.8 Da. The fraction with RT of 11.8 min corresponds to solution salts or other low molecular mass components from the affinity chromatography elution fractions.

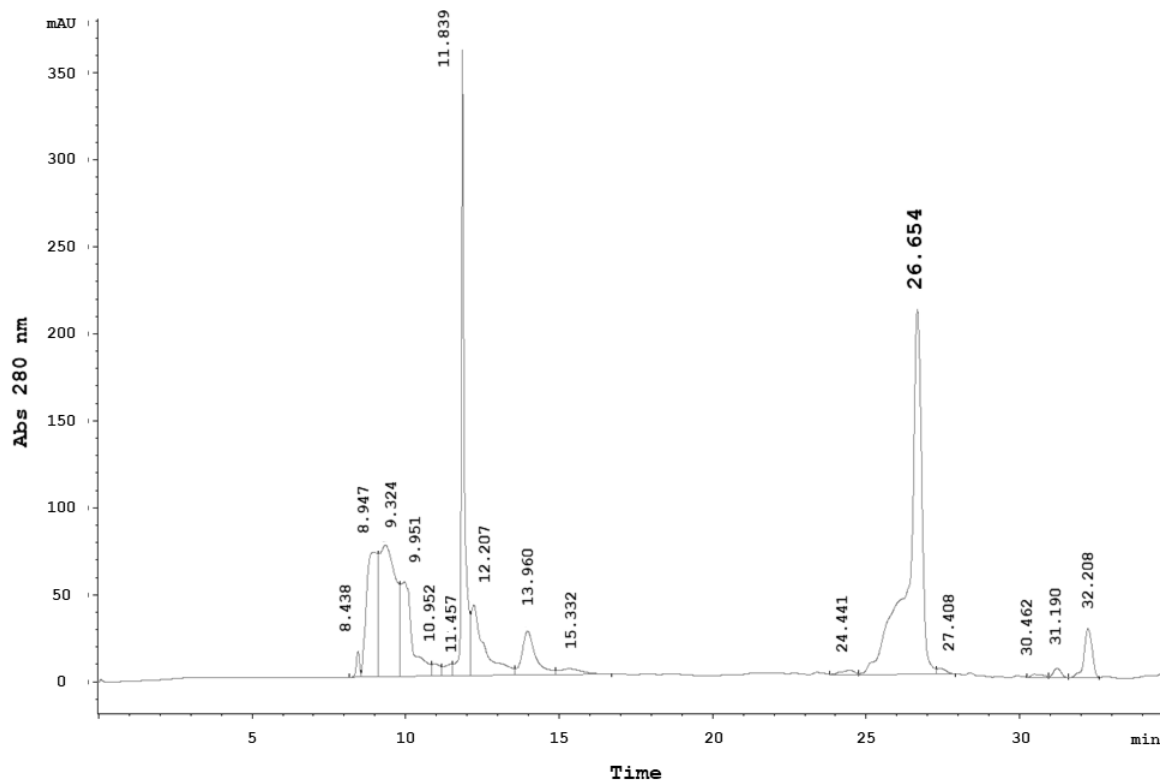


Figure 3. rpHPLC chromatogram of recombinant J1-1_K45E. A fraction with RT 26.654 min, was further analyzed by mass spectrometry to confirm mutant defensin identity. The phase gradient was from 10 to 100 and ACN in 30 min. Nickel affinity purified fractions of J1-1_K45E were loaded into the C₁₈ column. X axis, is RT in min. Y axis is absorbance at 280 nm.

Immunodetection of recombinant peptides

After rpHPLC purification, J1-1 and J1-1K_45E were analyzed by SDS-PAGE and by WB (Figure 4). Furthermore, to observe differences in the oligomeric profile between J1-1 and J1-1K_45E, anti-J1-1 polyclonal antibodies were used to observe oligomer formation before and after cross-linking reaction. Before cross-linking, the J1-1 antibodies were able to recognize the recombinant mutant J1-1_K45E of the monomers, dimers, and trimers (Figure 4).

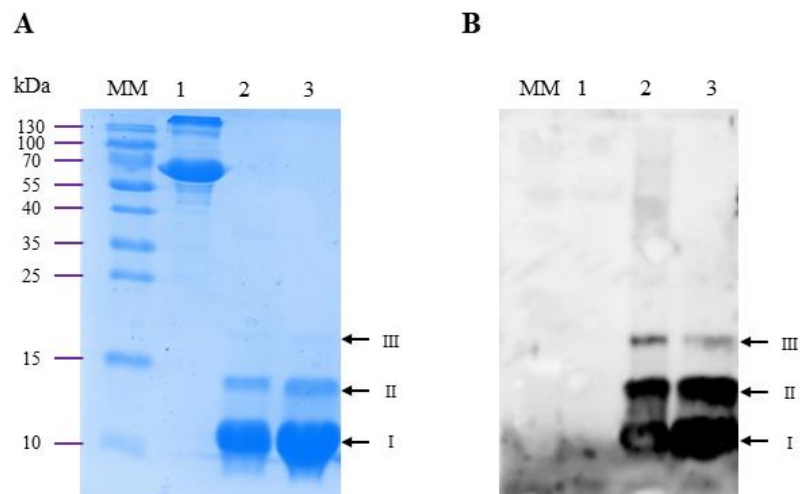


Figure 4. Detection of J1-1 and J1-1K45E by SDS-PAGE and WB. **A)** SDS-PAGE, lane 1, BSA, lane 2, recombinant J1-1, and lane 3 recombinant J1-1_K45E. **B)** The Western blot is replica of the SDS-PAGE from figure 4A where proteins were transferred to a PVDF membrane and it was immunodetected by anti-J1-1 polyclonal antibodies. Black arrows indicate the monomers (I), dimers (II) and trimers (III).

Dimeric 3D models and surface potential

The homology 3D model of J1-1 was obtained to predict the structure of defensins and contribute to the analysis of structure-function relationship. The 3D model of J1-1 was built on the structural template from *Medicago truncatula*, MtDef4 (PDB: 2LR3) with a sequence identity of 48.9 %. The structure model of J1-1 contains a conserved triple-stranded β -sheet (β 1- β 3) and the α -helix, illustrating the conserved plant defensins CS $\alpha\beta$ fold (Figure 5A). To observe the effect of the charge inversion in J1-1_K45E in comparison with J1-1, the molecular surface electrostatic potential of dimers analysis was performed using the modeled peptides in PyMOL. The analysis showed the expected increment in the negative surface area, located as a negatively charged patch shown in red in the J1-1_K45E dimer (Figure 5C) and absent in J1-1 dimer (Figure 5B).

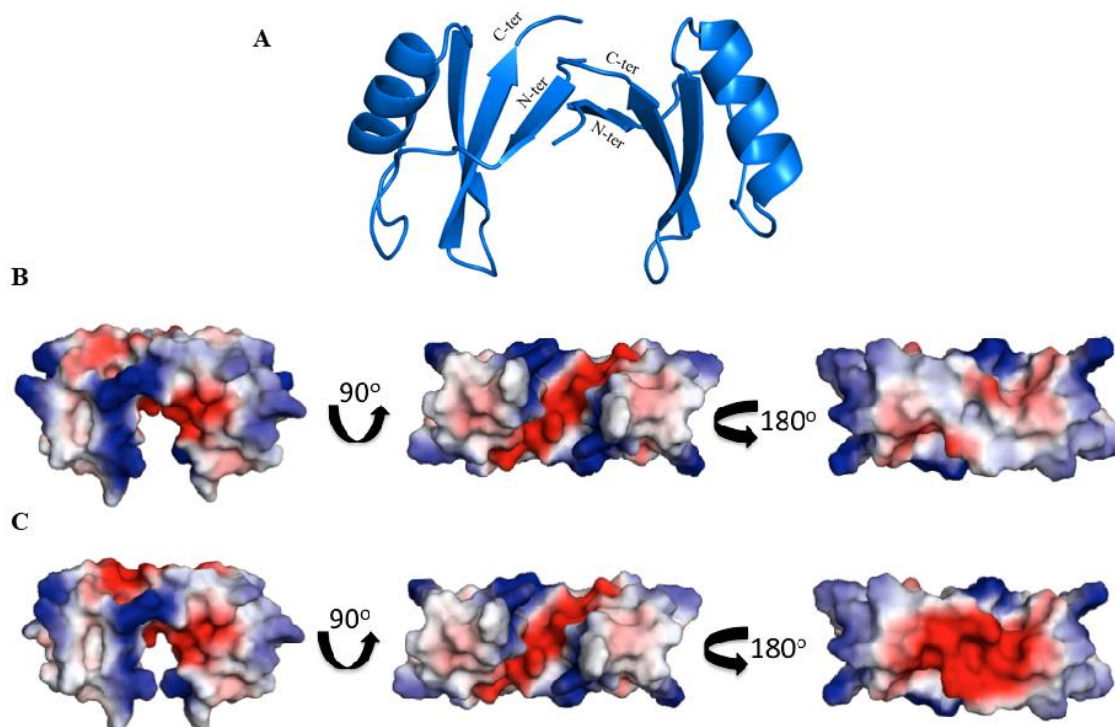


Figure 5. J1-1 and J1-1_K45E molecular surface electrostatic potential of dimers. **A)** 3D structure of J1-1 dimer obtained by homology modeling. **B)** Surface electrostatic potential of J1-1 and **C)** Molecular surface electrostatic potential of dimers of J1-1_K45E. Models were generated using PyMOL with default settings. Template was the plant defensin NaD1 (PDB: 5KK4), which was selected for homology modeling of J1-1 and J1-1_K45E.

Oligomerization of recombinant defensins

The capability of J1-1_K45E and J1-1 to oligomerize in solution was investigated using the BS³ chemical cross-linker, in the presence or absence of PA and NaCl (Figure 6). Oligomers in presence or absence of PA or NaCl were observed for J1-1 and J1-1_K45E recombinant peptides in Coomassie blue stained SDS-PAGE. Protein bands around 7, 14, ~21, ~28 and ~35 kDa were present, which would be equivalent to monomers, dimers, trimers, tetramers and pentamers of each peptide. It is worth mentioning that rpHPLC purified peptides without any treatment showed specific laddering patterns, the most abundant bands were the smaller oligomers observed corresponding to monomers, dimers and trimers (Figure 6A and 6C). In the control oligomerization patterns (rpHPLC purified peptide), tetramers and pentamers appeared after BS³ cross-linking for both, J1-1_K45E and J1-1. It was noticed that oligomers under 205 kDa for J1-1 are present when NaCl is

added in the cross-linking reaction (Figure 6C, lanes 4 and 5). For J1-1_K45E, there is not a clear difference in larger molecular mass oligomers observed among the different reaction conditions in SDS-PAGE (Figure 6A, lanes 2 to 5). To better observe differences in larger mass oligomerization patterns, the cross-linked peptides J1-1_K45E (Figure 6B) and J1-1 (Figure 6D) were analyzed by WB, with anti-J1-1 polyclonal antibody. As in SDS-PAGE; J1-1 forms high mass oligomers in the presence or absence of PA, with no noticeable effect in cross-linking reactions with or without NaCl, (Figure 6D, lanes 3-5). The same pattern is observed in lane 2 that only contains J1-1 cross-linked with BS³. J1-1_K45E, was detected in a different laddering pattern that is evidence of a change in higher mass oligomers, undefined bands are mainly observed in reactions conducted with PA and NaCl (Figure 6B, lanes 3 and 4). On the other hand, cross-linked J1-1_K45E showed oligomers without PA or NaCl that are immunodetected in a similar laddering pattern (Figure 6B, lane 2).

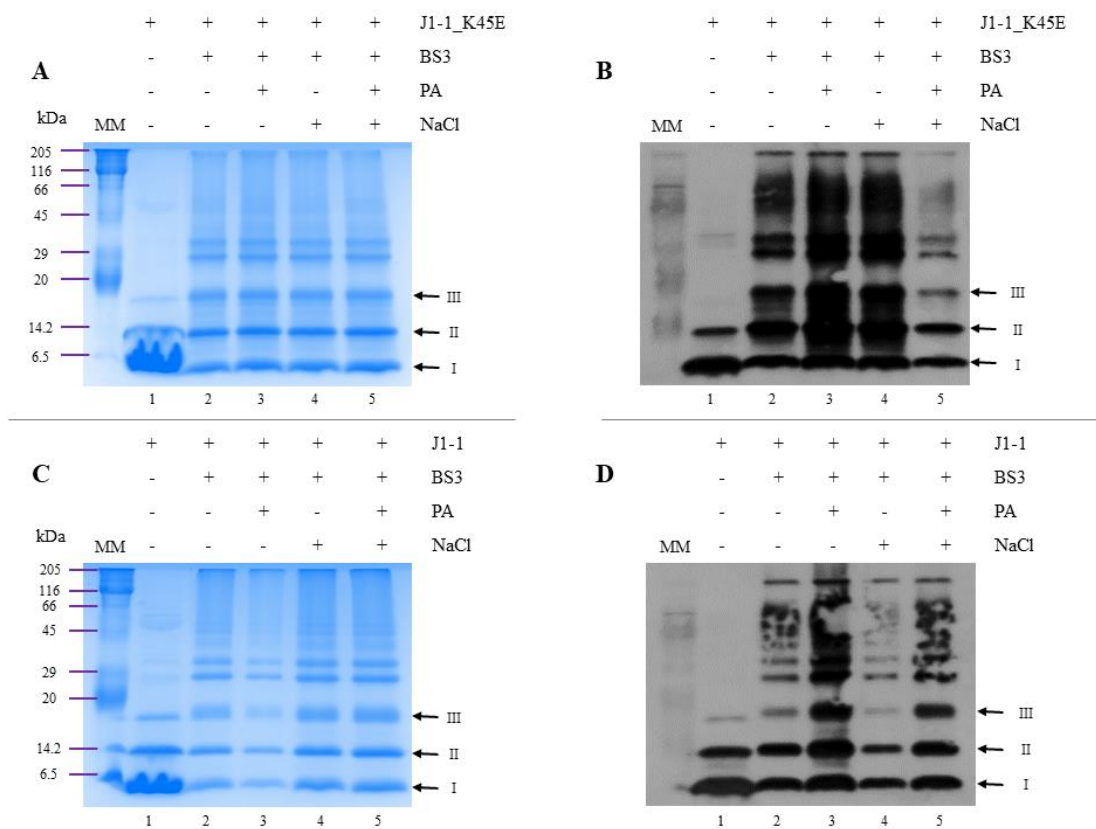
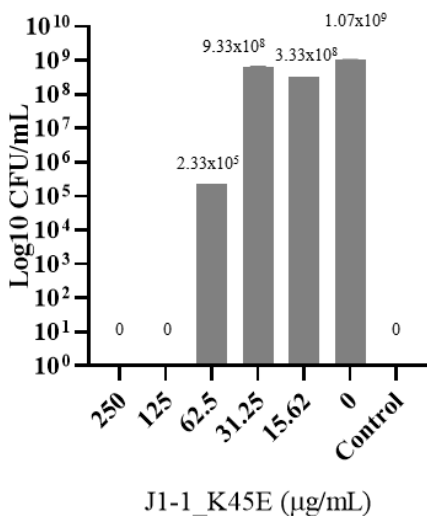


Figure 6. J1-1 and J1-1_K45E cross-linking and immunodetection. **A)** SDS-PAGE of J1-1_K45E and cross-linking products stained with Coomassie blue; **B)** WB with J1-1_K45E cross-linking products, reactions, with or without PA or NaCl; **C)** SDS-PAGE of J1-1 and cross-linking products stained with Coomassie blue and **D)** WB with J1-1 cross-linking products, reactions, with or without PA or NaCl. Lanes from 1 to 5 indicated the reagents used, where + means added reagent, and – means non-added reagent. Roman numbers indicate monomers (I); dimers (II); and trimers (III).

Antibacterial activity

Antibacterial activity of J1-1_K45E was evaluated on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Figure 7). Although the absorbance at 600 nm was measured it was not conclusive because at high concentrations peptide aggregation interfered with absorbance due to bacterial growth. Yet, total inhibition of cell growth was obtained at 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *P. aeruginosa* and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *S. aureus*. These values were confirmed by performing CFU plate assays; so, the CFU remaining values for *P. aeruginosa* were in the range of 3.3×10^8 to 2.3×10^5 at 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, of J1-1_K45E, compared to the positive control value of 1.1×10^9 CFU/mL. In contrast, CFU for *S. aureus* were 3.3×10^8 and 6.7×10^6 at concentrations of 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Bacterial growth control (without peptide or gentamicin) was 4.7×10^8 CFU/mL.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



Staphylococcus aureus ATCC 29213

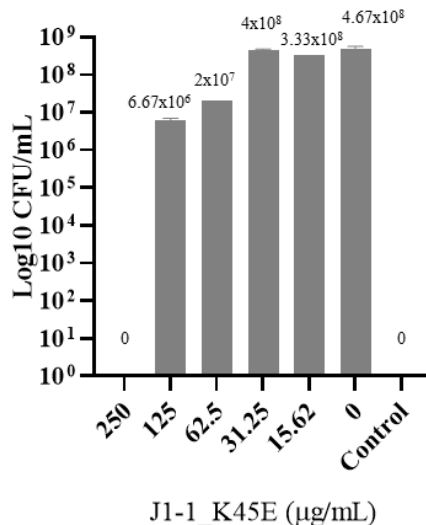


Figure 7. Antibacterial activity of J1-1_K45E against. **A)** *P. aeruginosa* ATCC 27853. Control is gentamicin 4 $\mu\text{g/ml}$ and **B)** *S. aureus* ATCC 29213. Control is gentamicin 16 $\mu\text{g/ml}$. Axis X, is peptide concentration ($\mu\text{g/mL}$); axis y, CFUs/mL after 18 hours, 37 °C.

J1-1 K45E in vitro lipid binding

The lipid binding profile of recombinant J1-1 was previously reported. J1-1 binds to mono, bisphosphates and trisphosphates PIs and PA *in vitro* (Guillén-Chable *et al.* 2017). In this work, the mutant J1-1_K45E lipid binding profile was obtained *in vitro* with PIP Strips. Recombinant defensin J1-1_K45E exhibit a single amino acid charge inversion in comparison to J1-1 (K 45 for an E), but a reduction in cationic charge of two units. Interestingly, J1-1_K45E binds to PtdIns (4,5) P2, PtdIns (3,4,5) P3, PA and PS on P-6001 strip. In contrast, J1-1_K45E did not bind neither mono- PIs, PtdIns (3,4) P2 nor PtdIns (3,5) P2. Identical results from two independent assays are shown in figure 8. Remarkably, J1-1_K45E binds to PS.

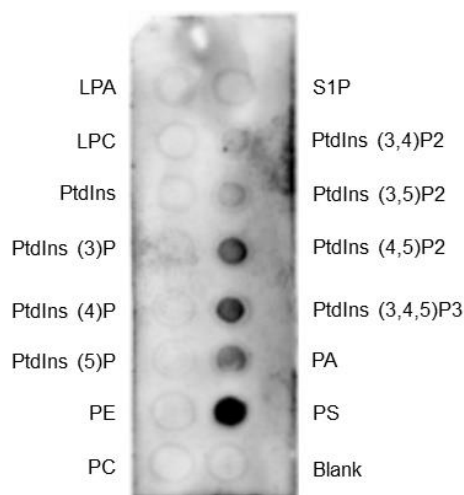


Figure 8. J1-1_K45E lipid binding. J1-1_K45E binds to PtdIns (4,5) P2, PtdIns (3,4,5) P3, PA and PS *in vitro*. (Echelon, P-6001).

Discussion

In this work, we report the purification and characterization of the point mutant J1-1_K45E. This point mutant has a Glu residue instead of a Lys residue at position 45 of mature J1-1. This mutant peptide was successfully expressed and purified as well as J1-1. The point mutation, changed the total charge from +4 in J1-1, to +2.1 in J1-1_K45E. It is already known that under physiological salt concentrations the effectiveness of AMPs might be affected by reducing electrostatic interactions between the cationic amino acids and anionic surface of the microbial membrane and the presence of cations such as Na⁺ or K⁺, disturb the protein-protein interactions, which would directly affect the oligomer formation (Kerenga *et al.* 2019). Lipid-dependent oligomerization has been described as a key event in the mechanism of action of plant defensins on fungal cells, disruption of the oligomer formation is associated with a reduction in the biological activity of plant defensins (Poon *et al.* 2014; Kvensakul *et al.* 2016; Järvå *et al.* 2018). In the SDS-PAGE analysis of proteins stained with Coomassie blue we observed very similar peptide patterns before and after cross-linking reactions. To observe oligomers in several conditions, such as NaCl presence, PA presence or both, different cross-linking reactions were designed. Detection of low quantities of peptides were achieved by WB, after reducing and denaturing conditions and specific patterns were identified for each peptide. We observed that the oligomer patterns change due to mutation K45E, and that the capacity to oligomerize is not dependent on the NaCl or PA presence.

To our knowledge this is the first report that points out the enhancement of antibacterial activity by reducing the cationicity of a plant defensin. J1-1_K45E showed antibacterial activity in the two strains tested. In a previous work on J1-1, the MIC for *P. aeruginosa* was determined in 250 µg/mL but it did not inhibit *S. aureus* at the same concentration (Guillén-Chable *et al.* 2017). In this work, an enhanced antibacterial activity on *P. aeruginosa* was observed at peptide concentration of 125 µg/mL and unexpectedly, this point mutant kills *S. aureus* at 250 µg/mL. The antibacterial activity of J1-1_K45E might be influenced by the global electrostatic charge, but also it might be related to the lipid

selectivity or to the J1-1_K45E oligomerization pattern. It is important to highlight those antimicrobial mechanisms described on fungal cells are different, even when distinct susceptible fungal genus is described. Furthermore, antibacterial defensins have been reported to bind not only to membrane lipids, but additional ligands such as cell wall constituents, enzymes or intracellular targets as DNA and ribosomes have been identified (Velivelli *et al.* 2018; Sathoff *et al.* 2019).

J1-1_K45E binds to PtdIns (4,5) P2, PtdIns (3,4,5) P3, PA and PS *in vitro*. Interestingly, J1-1 did not bind to PS, but as previously reported, it binds to mono-PtdIns, tris-PtdIns, PA and also to bis-PtdIns (3,4) P2 and PtdIns (3,5) P2. Such difference in lipid-binding, suggests a role of the residue K45 in selectivity related to charge or size of the lipid head group that, when substituted by an opposite charged side chain it could bind PS. This is important in the first step for membrane interaction or necessary to enter across the membrane to reach intracellular target receptors as described for antifungal plant defensins (Poon *et al.* 2014; Baxter *et al.* 2015; Järvå *et al.* 2018). Lipids in bacterial membranes are important structural and functional constituents, and targets of several types of AMP. Membrane lipids perform variable roles in cellular events as structural components or as signaling molecules (Tam *et al.* 2015). In this context, the binding of J1-1_K45E to PS is relevant due to its physiological cellular functions described. PS is an anionic lipid found on the cellular membranes, that under homeostatic conditions is typically restricted to the inner leaflet of the plasma membrane, has a key role in conditions such as: an apoptosis, protist apoptotic mimicry -a condition where pathogens, expose PS on the membrane to gain enter to the host cells to deploy its virulence- and PS externalization in some cancer cell lines (Calianese and Birge, 2020). In this sense, further work is needed to explore the J1-1_K45E binding to cancer cells or to evaluate its effect on other pathogens using the apoptotic mimicry.

Conclusions

In conclusion, the positive charge of the Lys residue in position 45, is determinant for oligomerization and lipid-binding of J1-1, but interestingly the residue Glu 45 enhance peptide antibacterial activity on *P. aeruginosa* and also confers activity on *S. aureus* that was not previously observed for J1-1. This work highlights the role of the residue K45 as a key structural determinant for head group phospholipid interactions and the role of K45 in J1-1 oligomerization. On the other hand, the improved antibacterial activity of J1-1_K45E is contrary to the accepted idea that more positively charged plant defensins exert better antimicrobial activity. More structure-function studies considering dimeric or oligomeric forms of these peptides are necessary to accurately elucidate antibacterial plant defensins mode of action.

Abbreviations:

ACN, acetonitrile;

AMPs, antimicrobial peptides;

ATCC, American type culture collection;

BS³, bis sulfosuccinimidyl suberate;

CFUs, colony forming units;

CS $\alpha\beta$, cysteine stabilized alpha beta structure;

Da, Dalton; DNA, Deoxyribonucleic Acid;

GRAVY index, Grand average of hydropathicity index;

GST, Glutathione S-transferase;

HRP, Horseradish peroxidase;

HPLC, High-performance liquid chromatography;

IC₅₀, Inhibitory concentration at 50 %;

IPTG, Isopropyl thiogalactoside;

K⁺, Potassium;

kDa, Kilodaltons;

M, Molarity;

MHB, Mueller-Hinton broth;

MICs, Minimum inhibitory concentrations;

Na⁺, Sodium; NaCl, Sodium chloride;

Ni-NTA, Nickel-nitrilotriacetic acid ;

NsD7, *Nicotiana suaveolens* defensin;

OsAFP1, *Oryza sativa* defensin;

PA, Phosphatidic acid;

PCR, Polymerase Chain Reaction;

PDB, Protein Data Bank;

PIs, Phosphatidylinositol;

PIP, Phosphatidylinositol phosphate;

PS, Phosphatidylserine;

PVDF, Polyvinylidene difluoride membrane;

RNA, Ribonucleic acid;

rpHPLC, reverse-phase High Performance Liquid Chromatography;

RT, Retention time;

SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;

TBS, Tris buffer saline; TBS-T, Tris buffer saline plus Tween 20;

WB, western blot.

Acknowledgments

This work was supported partially by CONAHCyT 303045. GAMP received the CONAHCyT scholarship No. 775005.

Autor contributions:

G.A.M. P. and F.A.G.C. obtained main data about peptide activity, structural models and oligomerization; G.E. and G.C. made substantial contributions to conception and design, and analysis and interpretation of data; I.A.S and L.A.S.C. have been involved in revising and critically drafting the manuscript and contributed to intellectual content; and all authors have given final approval of the version to be published and agreed about the accuracy of the work.

The authors confirm that they have no conflicts of interest.

JPPR-01915-2024-04

Journal of
Plant Protection Research

Decision: **Accept**

Ref.: Ms. No. JPPR-01915-2024-04
Antibacterial Activity Improvement in a Point Mutant K45E of the Pepper Defensin J1-1
Journal of Plant Protection Research

Dear Dr. Estrada,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Plant Protection Research.

It was accepted on 2024-03-14

We highly encourage cite in reference list manuscripts published in JPPR.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kindest regards,
Prof. Jolanta Kowalska
Journal of Plant Protection Research