

## PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

Alejandra B. CARDILLO<sup>1,2</sup>, María C. MARTÍNEZ CERON<sup>1,2</sup>, Stella M. ROMERO<sup>3,4</sup>, Osvaldo CASCONE<sup>1,2</sup>, Silvia A. CAMPERI<sup>1,2</sup> y Silvana L. GIUDICESSI<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Biotecnología, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Int. Güiraldes 2160 Pabellón II. 4to Piso. L6, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Micología y Botánica (InMiBo). Int. Güiraldes 2160 Pabellón II. 4to Piso. L6, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.

\* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: silvanagiudicessi@gmail.com

RESUMEN.....	28
SUMMARY: Plant antimicrobial peptides .....	29
INTRODUCCIÓN .....	29
Características de los AMPs .....	30
AMPs provenientes de plantas .....	32
1. Defensinas.....	32
1.1. Características generales .....	32
1.2 Actividad biológica .....	33
2. Tioninas.....	34
2.1 Características generales .....	34
2.2 Actividad biológica .....	34
3. Péptidos tipo heveína (hevein-like peptides) .....	35
3.1 Características generales .....	35
3.2 Actividad biológica .....	36
4. Knotinas .....	36
4.1 Características generales .....	36
4.2 Actividad biológica .....	37
5. $\alpha$ -harpininas.....	38
5.1. Características generales .....	38
5.2 Actividad biológica .....	39
6. Proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y snakinas .....	39
6.1.1 Características generales de las LTPs.....	39
6.1.2 Características generales de las snakinas .....	39
6.2.1 Actividad biológica de las LTPs.....	40
6.2.2 Actividad biológica de las snakinas .....	40
CONCLUSIÓN.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

### RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son pequeñas moléculas con menos de 50 aminoácidos, principalmente con carga positiva e importantes propiedades antibacterianas y antifúngicas. Se cree que el principal mecanismo de acción contra los diferentes patógenos es la ruptura de membranas, que puede darse mediante tres modos de acción: modelo de duela de barril, modelo de agujero de gusano (o poro

toroide) y modelo de alfombra. Particularmente en las plantas, la mayoría de los AMPs son ricos en cisteína, lo que permite la formación de numerosos puentes disulfuro (entre dos y seis). Esta característica les da el nombre de CRPs (*cysteine-rich peptides*) o péptidos ricos en cisteína. Los puentes disulfuro les confieren a los AMPs una alta estabilidad química, térmica y proteolítica. En este trabajo se describen las características de siete familias: defensinas, tioninas, heveínas, knotinas,  $\alpha$ -harpininas, proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y snakinas. Cada familia presenta propiedades distintivas, si bien existen semejanzas entre ellas, como sus propiedades antimicrobianas y fragmentos de secuencias de aminoácidos comunes. Considerando que dichos péptidos han participado por milenios en la defensa de las plantas por su eficiencia y estabilidad, ésto los convierte en ventajosos frente a los fármacos actuales más susceptibles a generar resistencia. Se cree que su estudio y explotación podrá servir en el futuro en aplicaciones en la industria agrícola, farmacéutica y biotecnológica, lo que mejoraría la calidad de vida.

**PALABRAS CLAVE:** antibacterianos, antifúngicos, defensinas, péptidos ricos en cisteína.

### SUMMARY: PLANT ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Antimicrobial peptides (AMPs) are mainly positive charged small molecules of less than 50 amino acids, with antibacterial and antifungal properties. The main mechanism of action against pathogens is the cell membrane disruption, which can occur through three modes of action: barrel-stave model, the worm hole (or toroid pore) model, and carpet model. Particularly in plants, most of the AMPs are cysteine-rich peptides (CRPs), which allow the formation of numerous disulfide bridges (between two and six). The disulfide bridges give the AMPs a high chemical, thermal and proteolytic stability. In this work, the characteristics of seven families are described: defensins, thionins, heveins, knottins,  $\alpha$ -harpinins, Lipid Transfer Proteins (LTPs) and snakines. Each family has distinctive properties, although there are similarities between them, such as their antimicrobial properties and common amino acid sequences. Considering that these peptides have participated for millennia in the defense of plants due to their efficiency and stability, this makes them advantageous compared to the current drugs that are more susceptible to generate resistance. Their study and exploitation could be useful for future applications in the agricultural, pharmaceutical and biotechnology industry, which will improve the life quality.

**KEY WORDS:** antibacterial, antifungal, cysteine-rich peptides, defensins.

### INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son moléculas pequeñas que componen el grupo de moléculas de inmunidad innata (Kanafani & Perfect, 2008). Estas moléculas suelen tener un tamaño que varía de 10 a 55 residuos de aminoácidos y sus conformaciones espaciales pueden ser muy diversas. Son moléculas que se sintetizan a nivel ribosomal y se modifican a nivel postraduccional. Actualmente, se han registrado más de 2900 péptidos antimicrobianos en el *Antimicrobial Peptide Database* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), donde están catalogados de acuerdo a su origen y propiedades antimicrobianas. Los AMPs provienen de diferentes fuentes: animal, vegetal, bacteriano o protozoario, y presentan diferentes longitudes y estructuras (Bulet *et al.*, 2004). Participan en el sistema de defensa contra distintos patógenos, como bacterias, virus y hongos. Algunos de los AMPs matan a los patógenos microbianos en forma directa, mientras que otros actúan indirectamente modulando sistemas de defensa del hospedador (Fox, 2013). La mayoría de los AMPs tienen capacidad de ser antibacterianos, pero algunos

de ellos a su vez también son antifúngicos. Estos últimos han cobrado particular interés en los últimos años debido a la baja disponibilidad de antifúngicos contra patógenos humanos, de animales o de plantas de interés agroindustrial y al aumento de cepas resistentes (Akkan, 2016). Todavía quedan muchos AMPs a los que no se les han estudiado exhaustivamente sus propiedades antifúngicas, lo que podría abrir aún más el campo de explotación de dichos péptidos.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS AMPs

Los AMPs pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su carga: catiónicos, neutros y aniónicos, aunque la mayoría son catiónicos y despliegan una carga neta positiva entre +1 y +15. Los aminoácidos más abundantes suelen ser lisina y arginina (Akkan, 2016). La carga positiva cumple una función importante a través de la cual se inicia una unión electrostática con la membrana, que porta carga negativa. Sin embargo, la actividad antimicrobiana no necesariamente se incrementa con la carga positiva, ya que la actividad depende también de la secuencia de aminoácidos y de la estructura secundaria (Zhang & Zhu, 2010). A diferencia de los péptidos catiónicos, los AMPs aniónicos exhiben una carga neta negativa que muchas veces lleva a una repulsión con la carga negativa de la membrana. Se ha encontrado que la carga negativa no es un prerrequisito para la unión a la membrana y la clave en esta interacción es la distribución de la carga y la estructura secundaria (Soscia *et al.*, 2010).

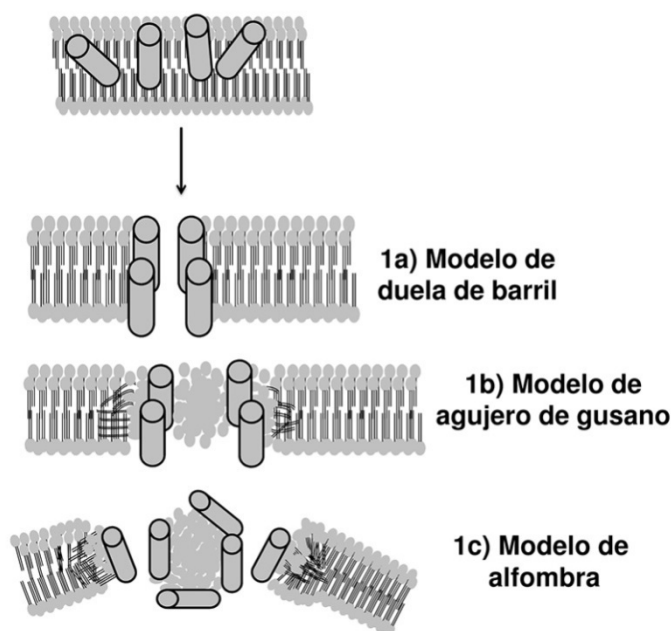
En cuanto a la longitud del péptido, el número de aminoácidos juega un rol importante en la estructura secundaria y en el modo de acción de los AMPs. La mayoría de los AMPs presentan entre 11 y 40 aminoácidos (Soliman *et al.*, 2011; Nagant *et al.*, 2012). Aquellos péptidos antifúngicos que superaron las fases clínicas y están a punto de salir al mercado presentan menos de 15 aminoácidos, y el 20% de ellos son sintéticos (Duncan & O'Neil, 2013; Fox, 2013).

Algunas desventajas que presentan los AMPs son: pobre absorción en los tejidos, rápida degradación *in vivo* y baja estabilidad. También pueden presentar respuesta de hipersensibilidad; incluso la mayoría de los péptidos que son excretados rápidamente presentan baja viabilidad y son sensibles a la presencia de sales (Akkan, 2016). Sin embargo, el conocimiento que se tiene de estos péptidos permite modificarlos químicamente para compensar estas desventajas. Por otro lado, la aparición de nuevas cepas resistentes hace necesario el desarrollo de otras alternativas, por lo que se espera en un futuro la producción de fármacos basados en péptidos. Además, las características presentes en los AMPs (rápida acción, amplia actividad, alta sensibilidad y baja resistencia microbiana) los hacen buenos agentes terapéuticos. Por esto se han sintetizado varios de estos AMPs como potenciales fármacos (Campese *et al.*, 2009). Es importante destacar que los tejidos de la mayoría de los organismos multicelulares expresan naturalmente *cocktails* de péptidos con gran cantidad de AMPs que, a su vez, han mostrado especificidad por la molécula blanco y baja toxicidad (Zasloff, 2002).

Se cree que el principal mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es la ruptura de membranas. Como consecuencia, se produciría una fuga de metabolitos, la despolarización de la membrana, interrupción de los procesos respiratorios y, finalmente, la muerte celular (Barbosa Pelegrini *et al.*, 2011). La interacción de los péptidos con la membrana lipídica es posible gracias a su estructura anfipática y, en algunos casos, a la carga positiva a pH fisiológico, lo que permite la atracción entre las cargas negativas de las membranas y la carga positiva de sus residuos básicos (Pelegrini & Franco, 2005). Esta interacción permite la acumulación de péptidos intramembrana hasta llegar a un umbral en el cual se produce el colapso y la membrana se rompe. Nawrot *et al.* (2014) describen tres tipos de modelos de ruptura de membrana: 1) modelo de duela de barril, 2) modelo de agujero de gusano (o poro toroide) y 3) modelo de alfombra. Estos mecanismos de acción son comunes en los péptidos antimicrobianos.

1. Modelo de duela de barril: Los péptidos se ubican en la membrana con los residuos hidrofóbicos orientados hacia el interior de la bicapa lipídica y los hidrofílicos orientados hacia la luz del poro (Fig. 1a).
2. Modelo de agujero de gusano: los péptidos se reorientan en la membrana y arrastran los lípidos con ellos mediante interacciones electrostáticas. La membrana sufre un doblez y forma un poro toroidal (Fig. 1b).
3. Modelo de alfombra: los péptidos actúan como detergentes, cubriendo la membrana electrostáticamente (en forma monomérica u oligomérica). Esta "alfombra" de moléculas anfipáticas desplaza los fosfolípidos, alterando las propiedades de la membrana y generando su ruptura (Barbosa Pelegrini et al., 2011, Fig. 1c)

Debido a que la actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos naturales resulta de su capacidad para romper la membrana más que de su efecto inhibitorio sobre cualquier enzima, tienden a ser menos vulnerables al desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Zhai & Xiaorong, 2011). Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) encontradas a lo largo de los diferentes estudios se encuentran entre 8 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , sin observarse en muchos casos presencia de células vivas a partir de los 64  $\mu\text{g/ml}$  (Pfaller, 2012). Se han aislado péptidos pequeños con propiedades antimicrobianas a partir de vegetales (Mandal *et al.*, 2011) y animales (Conlon *et al.*, 2004). Se han sintetizado AMPs en base a péptidos hallados en mamíferos (Nikawa *et al.*, 2004; Rossignol *et al.*, 2011) y animales marinos (Sonthi *et al.*, 2011; López-Abarrategui *et al.*, 2012; Pushpanathan *et al.*, 2012; Park & Lee, 2009), en anfibios (Park *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2006) y en insectos (Hwang *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012).



**Figura 1:** Modelos de ruptura de membrana tomado de Nawrot *et al.* (2014). a) modelo de duela de barril, b) modelo de agujero de gusano (o poro toroide) y c) modelo de alfombra.

## AMPS PROVENIENTES DE PLANTAS

Se ha encontrado que el 51% de los péptidos presentes en plantas presentan actividad antimicrobiana (Hammami *et al.*, 2009). Los AMPs son producidos en flores, raíces, tallos y hojas. La estructura de los AMPs obtenidos en plantas es similar a los obtenidos en animales e insectos (Salas *et al.*, 2015).

En las plantas, la mayoría de los AMPs en general son ricos en cisteína, lo que permite la formación de numerosos puentes disulfuro (entre dos y seis). Esta característica les da el nombre de CRPs (*cysteine-rich peptides*) o péptidos ricos en cisteína (Hammami *et al.*, 2009). Los puentes disulfuro les confieren a los AMPs una alta estabilidad química, térmica y contra peptidasas.

La clasificación de las familias de AMPs se basa principalmente en un número definido de residuos de cisteína presentes en la secuencia y en los aminoácidos que se encuentran entre dos cisteínas próximas. Se han identificado cerca de 12.800 péptidos ricos en cisteína (CRPs) en 33 plantas diferentes, y estos péptidos presentaron, a su vez, patrones de aminoácidos que se repiten entre las cisteínas (Silverstein *et al.*, 2007). En plantas modelos, como la planta de arroz y especies del género *Arabidopsis* Heynh., los CRPs componen el 3% de las proteínas.

Los AMPs de plantas se agrupan en diferentes familias, de acuerdo a sus características. Las más importantes son: defensinas, tioninas, péptidos del tipo heveínas (*hevein-type peptides*), péptidos del tipo knotinas (*knoctin-type peptides*), proteínas que participan en la transferencia de lípidos (*lipid transfer proteins*),  $\alpha$ -harpininas y snakininas (Tam *et al.*, 2015).

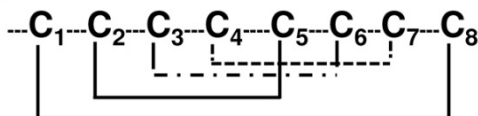
### 1. DEFENSINAS

#### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

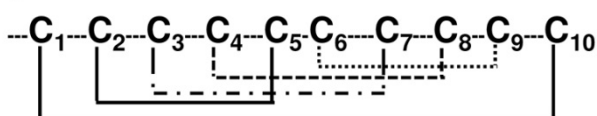
Esta familia de péptidos es la que más se conoce, y presenta numerosas aplicaciones antimicrobianas. Son moléculas de 45 a 54 aminoácidos, con 3 a 5 puentes disulfuro. Las uniones entre cisteínas (Cys-Cys) en las defensinas con 4 puentes disulfuro se corresponden a la forma Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 y Cys4-Cys7 (Fig. 2a). En el caso de tener 5 puentes disulfuro las uniones son: Cys1-Cys10, Cys2-Cys5, Cys3-Cys7, Cys4-Cys8 y Cys6-Cys9 (Fig. 2b). Presentan un peso molecular promedio de 6 kDa y carga positiva, con numerosos aminoácidos básicos. En general son péptidos monoméricos y sus secuencias de aminoácidos varían ampliamente, con excepción de las cisteínas, que se conservan a lo largo de toda la familia (Carvalho & Gomes, 2011). Las defensinas están ubicadas principalmente en la pared celular y en el espacio extracelular de las semillas (Terras *et al.*, 1995). También se las ha detectado en las vainas de las arvejas (Terras *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002), en xilema, células parenquimáticas y espacios periféricos de muchas especies (Kragh *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002). La presencia de cuatro o cinco puentes disulfuro conservados les confiere una estructura de pseudociclos formados por tres estructuras  $\beta$  antiparalelas y una hélice  $\alpha$ . Si bien su estructura es muy conservada, se han detectado modificaciones tanto a nivel de la estructura primaria como de la terciaria (Sitaram, 2006; Carvalho & Gomes, 2011). Estas características estructurales hacen que las defensinas se dividan en tres subfamilias:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ -defensinas. Las tres subfamilias difieren en la longitud de los segmentos peptídicos entre las cisteínas y el emparejamiento de las mismas que están conectadas por enlaces disulfuro (Ganz, 2003). La mayoría de las defensinas son moléculas anfipáticas que tienen grupos de aminoácidos positivamente cargados y cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos. Esto les permite interactuar con las membranas microbianas (carga positiva) y las

cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos. El campo eléctrico de la membrana empuja a las defensinas hacia el interior de la misma, generando una tensión, y el campo eléctrico transmembrana "tira" de las moléculas de péptido hacia el interior de la membrana. A medida que las defensinas se acumulan en una "alfombra", la membrana se tensa y se deforma, al cambiar la conformación de los péptidos. Este cambio da como resultado la formación de poros en la membrana (Ganz, 2003; Lohner *et al.*, 1997).

### a) NaD1



### b) PhD1



**Figura 2:** Uniones puente disulfuro de las defensinas NaD1 y PhD1, provenientes de la planta de tabaco *Nicotiana glauca* Link y Otto. a) NaD1 presenta cuatro puentes disulfuro, b) PhD1 presenta un quinto puente disulfuro entre las cisteínas C<sub>2</sub> y C<sub>5</sub> (tomado de Lay *et al.*, 2003).

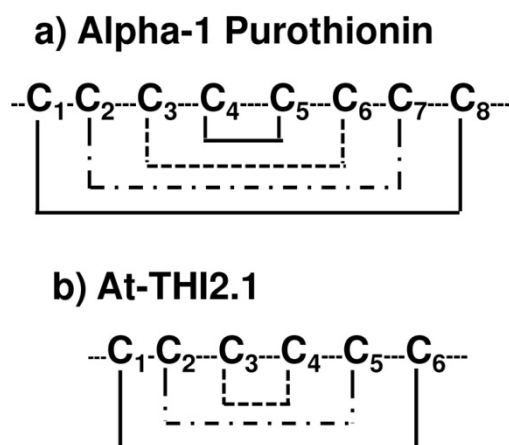
## 1.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Además de la actividad antibacteriana, las defensinas presentan actividad antifúngica (Fujimura *et al.*, 2003; Sitaram, 2006). Son inhibidoras de la actividad de tripsina (Wijaya *et al.*, 2000) y diferentes  $\alpha$ -amilasas de algunos insectos, hongos e incluso de la saliva humana (Méndez *et al.*, 1996). La primera actividad antifúngica y antimicrobiana registrada en defensinas de plantas fue observada en semillas de *Raphanus sativus* L. (Terras *et al.*, 1992). Inicialmente se observó que la actividad antifúngica se basaba en alterar el flujo de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Thevissen *et al.*, 1999), pero luego se comprobó que también algunas defensinas generaban permeabilización de la membrana plasmática (Thevissen *et al.*, 2000). Las defensinas funcionan como inhibidores de la traducción de proteínas,  $\alpha$ -amilasas e inhibidores de bloqueantes de los canales iónicos. Se ha observado que varias defensinas reducen *in vitro* la actividad de la transcriptasa inversa del VIH1 y exhiben un efecto antiproliferativo hacia varios tipos de células de cáncer de mama (Carvalho & Gomes, 2009 y 2011). Otros estudios han demostrado que diversas defensinas inducen también apoptosis de levaduras y especies fúngicas, dentro de las cuales se encuentra *Candida albicans* (Aerts *et al.*, 2007 y 2009). Las defensinas son los péptidos antimicrobianos más abundantes en el ser humano. Dadas las similitudes entre éstas y las de plantas, se han podido analizar las aplicaciones de las defensinas de un origen para atacar microorganismos patógenos del otro reino (Ganz, 2003).

## 2. TIONINAS

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las  $\alpha$  y  $\beta$  tioninas son péptidos catiónicos de 45 a 48 aminoácidos con tres a cuatro puentes disulfuro, y son los péptidos antimicrobianos prototipos de las plantas. Todos los grupos de  $\alpha/\beta$  tioninas presentan secuencias de aminoácidos homólogas y estructuras similares (Stec, 2006), ricas en arginina, lisina y cisteína (Nawrot et al., 2014). Existe otro grupo, las  $\gamma$  tioninas, que presentan una mayor similitud con las defensinas, e incluso, algunos autores las consideran dentro de esa clasificación (De Coninck et al., 2016). Están presentes tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas y son expresadas en una gran variedad de tejidos (semillas, hojas y raíces) (Steinmuller et al., 1986; Gausing, 1987). En comparación con las defensinas presentan una mayor secuencia de aminoácidos conservada dentro del grupo (Tam et al., 2015). Se clasifican como pseudociclos debido a la unión por puente disulfuro de extremo a extremo, lo que le confiere una estructura circular (Nawrot et al., 2014). En el caso de las tioninas que presentan ocho cisteínas, las uniones Cys-Cys son: Cys1-Cys8, Cys2-Cys7, Cys3-Cys6 y Cys4-Cys5 (Fig.3a). En las tioninas con seis cisteínas, las uniones se dan de la forma Cys1-Cys6, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys4 (Fig.3b).



**Figura 3:** Uniones puente disulfuro de las tioninas Alpha-1 Purothionin, proveniente de *Helleborus purpurascens* Fuss y (2a) y At-THI2.1, proveniente de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (2b). a) Alpha-1 Purothionin presenta cuatro puentes disulfuro (tomado de Tavormina et al., 2015) y b) At-THI2.1 presenta tres puentes disulfuro (tomado de Milbradt et al., 2003).

### 2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las tioninas fueron caracterizadas por su toxicidad contra bacterias, hongos, larvas de insectos y células animales y vegetales (Stec, 2006). Estudios *in vivo* e *in vitro* han propuesto tres mecanismos de acción: 1) mediante la formación de canales iónicos, 2) por el modelo de alfombra y 3) por disolución de la membrana lipídica (Stec, 2006). Por otro lado, varios estudios comprobaron que la lisina en la posición 1 y la tirosina en la posición 13 (ambas muy conservadas en las diferentes tioninas) juegan un papel crucial en su toxicidad (Evans et al. 1989; Stec et al., 2004; Fracki et al., 1992). En general, presentan toxicidad contra

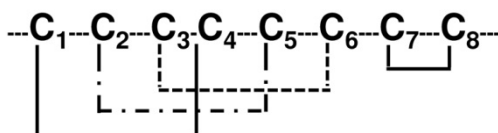
bacterias Gram positivas y negativas (Cammue *et al.*, 1992; Evett *et al.*, 1986; Florack *et al.*, 1993), hongos (Cammue *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993a) y levaduras (Hernández-Lucas *et al.*, 1974). Gracias a sus características químicas y físicas, su resistencia a diversos patógenos y su alta estabilidad, constituyen potenciales candidatas para la industria agrícola, ya que son una de las principales familias que componen el sistema de defensa de las plantas. Recientemente, se ha propuesto el uso de estos péptidos como potenciales inmunotoxinas en la terapia tumoral. En la búsqueda de productos naturales farmacológicamente activos, se descubrió un nuevo grupo de tioninas en las raíces de *Helleborus purpurascens* que, en consecuencia, se denominaron heletoninas (Milbradt *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha propuesto el desarrollo de una estrategia de protección de cultivos basada en tioninas que presenta varios beneficios, como el aumento de los rendimientos en la producción al minimizar las pérdidas por enfermedades microbianas, la reducción de los costos de los pesticidas y la disminución de la contaminación ambiental por plaguicidas. El sistema de protección de cultivos basado en las tioninas, especialmente la resistencia antifúngica, requiere niveles efectivos de producción de péptido y acumulación del mismo biológicamente activo. Avances recientes en el estudio de la función de tionina en células vegetales abren alternativas para utilizar esta familia de péptidos en el desarrollo de cultivos comerciales con una mayor resistencia antibacteriana y antifúngica (Gust *et al.*, 2010).

### 3. PÉPTIDOS TIPO HEVEÍNA (HEVEIN-LIKE PEPTIDES)

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La heveína es un péptido de 43 aminoácidos, rico en glicina y cisteína, con actividad sobre la quitina (Koo *et al.*, 1998). Fue purificada e identificada inicialmente en el látex del árbol del caucho, *Hevea brasiliensis*, y es uno de los componentes proteicos más abundantes del mismo. Los dominios de la heveína se unen a la quitina, que es la proteína blanco principal (Beintema, 1994; Kini *et al.*, 2015). Presenta ocho cisteínas y las uniones se forman entre Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>4</sub>, Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>5</sub>, Cys<sub>3</sub>-Cys<sub>6</sub> y Cys<sub>7</sub>-Cys<sub>8</sub> (Fig. 4). Los péptidos del tipo heveína son compuestos básicos de 29 a 45 aminoácidos con tres a cinco puentes disulfuro. A diferencia de las otras familias, los péptidos con estructuras homólogas a la heveína son ricos en glicina, contienen compuestos aromáticos a lo largo de sus secuencias y pueden presentar 6, 8 o 10 cisteínas (Tam *et al.*, 2015). Se han identificado unos 285 péptidos del tipo heveína, de los cuales 124 fueron encontrados en diferentes plantas. Presentan, además, la ventaja de ser térmicamente estables; sin embargo, se ha observado pérdida de actividad a pH ácido y condiciones reductoras (Koo *et al.*, 1998 y 2002). Gracias a su capacidad de unión a la quitina, los péptidos tipo heveína son útiles para estudiar la interacción de péptidos con hidratos de carbono, la cual se basa principalmente en uniones puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Tam *et al.*, 2015).

#### Hb-HEV1



**Figura 4:** Uniones puente disulfuro de la heveína Hb-HEV1 proveniente de *Hevea brasiliensis* (tomado de Tavormina *et al.*, 2015).



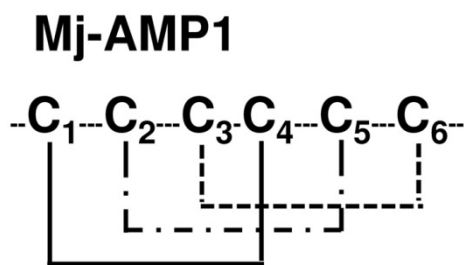
### 3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Existe un gran interés médico por la heveína, ya que se la ha relacionado con problemas de alergia, especialmente alergia al látex y el llamado síndrome de látex-fruta (Alenius *et al.*, 1995; Blanco, 2003; Díaz-Perales *et al.*, 1998). Existen varios péptidos/proteínas que presentan similitudes en sus dominios con la heveína, además de la heveína misma, y en todos se observó actividad antifúngica e insecticida (Raikhel & Lee, 1993). Los péptidos antimicrobianos tipo heveína poseen una importante actividad antifúngica *in vitro* (Archer, 1960; Van Parijs *et al.*, 1991). Inhiben también el crecimiento de la quitina en los hongos, protegiendo las plantas de una amplia variedad de patógenos fúngicos (Beintema, 1994). Slavokhotova *et al.* (2014) produjeron péptidos antimicrobianos recombinantes llamados “péptidos antimicrobianos de trigo” (WAMP por sus siglas en inglés) a los que se les adicionó un residuo de serina en el sitio de proteólisis del patógeno *Fungalysin*, permitiendo el incremento de la resistencia a metaloproteinasas fúngicas. Por otro lado, Wong *et al.* (2016) describieron el primer conjunto de péptidos del tipo heveína aislados y caracterizados a partir de gimnospermas. Como grupo, representan una nueva clase de péptidos tipo 8C-heveína que son ricos en prolina y libres de carga. Los resultados sugieren que estos péptidos pueden ser útiles para diseñar terapias peptídicas metabólicamente estables por sus características fisicoquímicas (Wong *et al.*, 2016). Otros péptidos del tipo heveína descubiertos y caracterizados han sido estudiados como potenciales andamios para el desarrollo de péptidos terapéuticos metabólica y oralmente activos. Tal es el caso de los péptidos del tipo heveína vH1 y vH2, de *Vaccaria hispanica*. Estas moléculas son ricas en glutamina, sin carga, con ocho cisteínas, un dominio de unión a la quitina y una estructura restringida por puentes disulfuro. Los estudios de estabilidad realizados mostraron que estos péptidos presentan además una estructura compacta que los hace resistentes a la degradación térmica, química y proteolítica (Wong *et al.*, 2017).

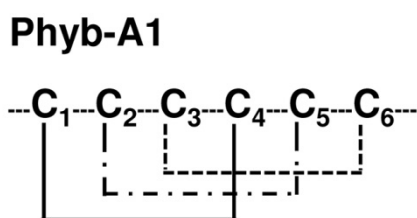
## 4. KNOTINAS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las knotinas, provenientes de las plantas, son moléculas pequeñas, de unos 30 aminoácidos, ricas en cisteína, al igual que las otras familias. Presentan 6 cisteínas que forman tres puentes disulfuro de la forma Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>4</sub>, Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>5</sub> y Cys<sub>3</sub>-Cys<sub>6</sub> (Fig.5). Estos puentes forman un “nudo” de cisteínas que se modifica a lo largo de las diferentes subfamilias. En estos péptidos están incluidos los ciclótidos (Fig.6) y los inhibidores de las familias de la  $\alpha$ -amilasa, tripsina y carboxipeptidasa. Las knotinas fueron descubiertas en la planta de papa como inhibidores de este último grupo de enzimas (Rees & Lipscomb, 1982). La mayoría son lineales, a excepción de los ciclótidos (knotinas cíclicas), y pueden encontrarse tanto en plantas, hongos e insectos, como en arañas. Los “nudos” de cisteínas son comúnmente encontrados en los distintos grupos de péptidos antimicrobianos vegetales y, a diferencia de otras familias que presentan secuencias aminoacídicas conservadas, las knotinas presentan zonas hipervariables.



**Figura 5:** Uniones puente disulfuro de la knotina Mj-AMP1 proveniente de *Mirabilis jalapa* L. (tomado de Tavormina *et al.*, 2015).



**Figura 6:** Uniones puente disulfuro del ciclótido Phyb-A1 proveniente de *Petunia hybrida* E. Vilm. (tomado de Tavormina *et al.*, 2015).

## 4.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Presentan una variedad de funciones como ser antimicrobiana, citotóxica, insecticida, anti VIH y similares a hormonas (Tam *et al.*, 2015; Pallaghy *et al.*, 1994). La acción de las knotinas es inhibitoria, lo que le confiere a la planta mecanismos de defensa contra hongos, insectos y otros patógenos (Konarev *et al.*, 2002). Se ha observado que presentan, especialmente los ciclótidos, estabilidad enzimática, térmica y química (Heitz *et al.*, 2008), además de resistencia a proteasas como tripsina, quimotripsina, pepsina y elastasa (Ireland *et al.*, 2006). También presentan funciones potencialmente farmacológicas, considerando sus actividades antimicrobianas, anti VIH y anti tumorales (Craik, 2012). Cabe aclarar que la estructura cíclica de los ciclótidos no estaría relacionada a su estabilidad ni a su flexibilidad, como demostraron Heitz *et al.* (2008). En general, las knotinas que presentan funciones membranolíticas son de naturaleza anfipática, característica necesaria para llevar a cabo su acción antimicrobiana. Sin embargo, al contrario de las tioninas y las defensinas de plantas, la mayoría de los ciclótidos no interaccionaría de forma electrostática con las membranas, dado que suelen ser débilmente positivos o neutros a pH fisiológico, debido a su estructura cíclica (Henriques & Craik, 2010). La estructura química de las knotinas resulta interesante para el desarrollo de nuevos fármacos, dado que presentan: (1) alta estabilidad proteolítica, térmica y química debido al ciclado de la cadena principal de los ciclótidos; (2) debido a su pequeño tamaño son fáciles de sintetizar químicamente y (3) se pueden generar múltiples variantes dada su tolerancia a incorporar diferentes aminoácidos a lo largo de su secuencia peptídica (Wong *et al.*, 2012). Su aplicabilidad en la industria farma-

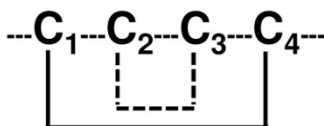
céutica es muy amplia, dado que presentan actividad anti VIH, antimicrobiana y penetran células (Gould *et al.*, 2011). Debido a su estabilidad ante enzimas proteolíticas y a las tasas relativamente altas de absorción intestinal, es posible la administración de estos péptidos por vía oral. Gracias al éxito obtenido con el diseño de la primera knotina utilizada para obtener imágenes tumorales y las que se comercializan como analgésicos o aquéllas que se encuentran en fase preclínica y clínica, se espera que muchos de estos péptidos sean utilizados en el desarrollo diagnóstico y terapéutico (Kolmar, 2009) en el futuro próximo. Por otro lado, se ha estudiado ampliamente la actividad anti-VIH de los ciclótidos como potenciales agentes terapéuticos. La primera actividad anti-VIH fue reportada por Gustafson *et al.* (2004), quienes buscaban nuevos productos naturales con actividad antiviral. En ese trabajo se demostró que varios ciclótidos aislados de la corteza del árbol africano *Chassalia parvifolia*, llamados circulinas A-F, inhibían la infección por el VIH en diferentes líneas celulares del hospedador. Desde entonces, también se ha demostrado que otros ciclótidos presentan actividad anti-VIH (Gustafson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Daly *et al.*, 2004). También se han utilizado los ciclótidos como modelos para el diseño de agentes antiangiogénicos en el tratamiento del cáncer y como agentes antiinfecciosos. Los efectos tóxicos de los ciclótidos, cuya función natural es insecticida, pueden eliminarse mediante mutagénesis simple. Esto resuelve el desafío de utilizar agentes insecticidas como candidatos en la terapia humana (Henriques & Craik, 2010).

## 5.A-HARPININAS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La familia de las  $\alpha$ -harpininas está compuesta por péptidos ricos en lisinas, glutaminas y argininas y, al igual que los otros AMPs, comparten la conservación de las cisteínas y los puentes disulfuro. Estos péptidos presentan dos puentes disulfuro de la forma Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>4</sub> y Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>3</sub> (Fig.7) (Tam *et al.*, 2015). La estructura secundaria, por otro lado, está representada por una  $\alpha$ -hélice, seguida de un *loop* y otra  $\alpha$ -hélice. Esta familia está muy poco estudiada; sin embargo algunos autores lograron caracterizar péptidos de esta familia obtenidos a partir de la hierba *Stellaria media* L., de la cual se logró obtener el perfil genómico, identificando no sólo este tipo de péptidos sino, además, defensinas, tioninas, heveínas, snakinas y otros péptidos ricos en cisteína (Slavokhotova *et al.*, 2017).

### MiAMP2c



**Figura 7:** Uniones puente disulfuro de la harpinina MiAMP2c proveniente de *Macadamia integrifolia* (tomado de Tam *et al.*, 2015).

## 5.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Hasta ahora se han estudiado muy pocas harpininas, incluyendo MBP-1, MiAMP2s, Ec-AMP1, Luffin P1, VhT1, BWI-2c, Tk-AMP-Xs, y Sm-AMP-X. MBP-1. Esta última presenta actividad inhibitoria contra varios hongos patógenos de plantas (Duvick *et al.*, 1992), mientras que MiAMP2 presenta actividad antifúngica *in vitro* (Marcus *et al.*, 1999). Las harpininas Tk-AMP-1, Tk-AMP-2 y Sm-AMP-X también presentan actividad antifúngica (Utkina *et al.*, 2013; Slavokhotova *et al.*, 2014) y VhT1 y BWI-2c presentan actividad inhibitoria de tripsinas (Connors *et al.*, 2007; Oparin *et al.*, 2009). La harpinina de mayor interés es la Luffin P1, ya que Ng *et al.* (2011) descubrieron que presentaba actividad anti-HIV-1 *in vitro* en células T infectadas.

## 6. PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS (LTPS) Y SNAKINAS

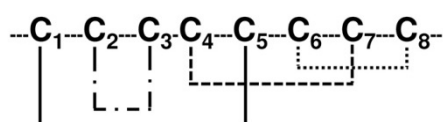
### 6.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LTPS

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) son polipéptidos (IUPAC-IUB, 1984) de menos de 10 kDa, compuestos por 70 a 90 aminoácidos. Son moléculas catiónicas con ocho cisteínas y se diferencian de los otros AMPs en que pueden unirse a una amplia gama de lípidos: ácidos grasos, fosfolípidos, prostaglandina B2 y acil-coenzima A. Por esta razón también se los denomina LTPs no específicos (Kader, 1996; Carvalho & Gomes, 2007). Existen dos subfamilias, LTP1, de 7 kDa y LTP2, de 9 kDa (Fig.8). Las uniones por puente disulfuro de las LTP1 se forman mediante los enlaces de Cys1-Cys6, Cys2-Cys3, Cys4-Cys7 y Cys5-Cys8, mientras que en LTP2 los enlaces son: Cys1-Cys5, Cys2-Cys3, Cys4-Cys7 y Cys6-Cys8 (Pons *et al.*, 2003). Los LTPs1 presentan una superficie hidrofóbica en el espacio de interacción con los lípidos gracias a residuos de aminoácidos como isoleucina, valina, leucina y alanina. Sin embargo, se pueden encontrar algunos aminoácidos hidrofílicos como arginina, serina o lisina (Simorre *et al.*, 1991). Estos puentes permiten una estructura espacial en la que se forma una cavidad hidrofóbica, en la cual las LTPs interactúan con los lípidos (Lee *et al.*, 1998).

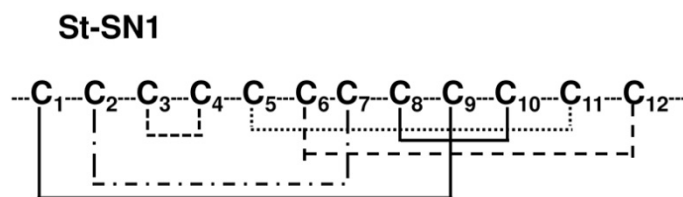
### 6.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS SNAKINAS

Al igual que las LTPs, las snakinas se componen de 70 a 90 aminoácidos y se dividen en dos subfamilias, las snakinas 1 y snakinas 2. Ambas presentan 12 cisteínas que se unen formando puentes disulfuro de la forma Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>9</sub>, Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>7</sub>, Cys<sub>3</sub>-Cys<sub>4</sub>, Cys<sub>5</sub>-Cys<sub>11</sub>, Cys<sub>6</sub>-Cys<sub>12</sub> y Cys<sub>8</sub>-Cys<sub>10</sub> (Fig.9), y su conformación espacial está dada por dos estructuras  $\alpha$ -hélices largas (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). El tamaño molecular de las subfamilias es muy similar, con 63 aminoácidos para las snakinas 1 y 66 para la snakinas 2. Las snakinas1 presentan un pequeño grado de similitud estructural con las tioninas (Porto & Franco, 2013).

#### Os-LTP2



**Figura 8:** Uniones puente disulfuro de la Os-LTP2 proveniente de *Oryza sativa* L. (tomado de Tavormina *et al.*, 2015).



**Figura 9:** Uniones puente disulfuro de la snakina St-SN1 proveniente de *Solanum tuberosum* L. cv *Jaerla* (tomado de Berrocal Lobo *et al.*, 2002).

### 6.2.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS LTPS

Las LTPs presentan actividad antifúngica y bactericida (Molina *et al.*, 1993b; Kader, 1996; Carvalho & Gomes, 2007). También promueven la permeabilización de la membrana de las células patógenas (Regente *et al.*, 2005). Si bien su modo de acción no está del todo descrito, algunos investigadores sugieren que podrían insertarse en las membranas de las células fúngicas y formar un poro que permitiría el flujo de salida de iones intracelulares, generando la muerte celular (Selitrennikoff, 2001). Estudios previos han demostrado que la cavidad hidrofóbica de las LTPs en plantas interactúa con una sola cadena acilo, pero no con una molécula fosfolípida completa (Shin *et al.*, 1995). Las dos cadenas de acilo del fosfolípido de la membrana pueden interactuar de manera diferente con el péptido, con una unión más débil que la otra, facilitando la extracción del fosfolípido cuando el LTP interactúa con la superficie de la membrana (Kader, 1996). En la planta de maíz, se observó que la reducción de las LTPs produjo una disminución en la actividad de transferencia de lípidos, lo que confirmaría la importancia de los puentes disulfuro en el proceso (Grobois *et al.*, 1993). También presentan actividad antifúngica contra patógenos humanos del género *Candida* Berkhout (Zottich *et al.*, 2011). También se ha propuesto el uso de los LTPs para transporte de drogas. Por ejemplo, los análogos éter de los fosfolípidos son conocidos como drogas anti-leishmania. Sin embargo, generan efectos secundarios graves que incluyen hemólisis, edema pulmonar, alteración en la función hepática y citotoxicidad. Existe interés en reducir los efectos secundarios que presentan las LTPs para ser utilizadas en el transporte de medicamentos (Pato *et al.*, 2001).

### 6.2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SNAKINAS

Estos péptidos presentan actividad antifúngica y antibacteriana y desempeñan diferentes funciones en la respuesta al estrés biótico y abiótico. Se ha estudiado su estructura terciaria con el objetivo de ser usados en aplicaciones terapéuticas y agrícolas (Oliveira-Lima *et al.*, 2017). Gracias a su actividad antifúngica y antimicrobiana se ha considerado a las snakinas como una fuente rica en compuestos de interés farmacéutico. Por esta razón se ha intentado su síntesis en fase sólida y comparado su efectividad con snakinas naturales, obteniéndose resultados muy favorables (Harris *et al.*, 2014). Esto abre posibilidades en el campo de la síntesis de biofármacos, especialmente por su estabilidad y eficiencia contra patógenos. La snakina Z de la planta *Ziziphus jujuba*, por ejemplo, presenta actividad contra hongos y bacterias, siendo inerte para las células humanas, lo que hace a la snakina Z un interesante candidato para ser utilizado como péptido antimicrobiano en diversas aplicaciones (Samriti *et al.*, 2018).

## CONCLUSIÓN

Los AMPs de las plantas ofrecen múltiples alternativas para mejorar la producción de nuevos fármacos y productos agroindustriales, gracias a sus propiedades fisicoquímicas y su alta estabilidad. El fenómeno de la “promiscuidad de péptidos y proteínas”, en el que múltiples funciones se asocian con una sola estructura peptídica, ha llamado la atención en varios campos de investigación, ya que un único péptido puede tener actividad inhibitoria contra múltiples patógenos. Esta cualidad parece crear un sistema eficiente de defensa de las plantas contra plagas de insectos y otros patógenos y, por lo tanto, es esencial para la supervivencia y la evolución de las mismas. Es por esto que se los considera potenciales candidatos para el diseño de fármacos novedosos y productos biotecnológicos sintéticos (Franco, 2011).

La mayoría de las últimas investigaciones se ha centrado en las propiedades antifúngicas y en el efecto antibacteriano de los AMPs de las diferentes familias (especialmente defensinas y tioninas), mientras que las propiedades antivirales han sido menos exploradas. La enumeración de las propiedades de la mayoría de las familias es incompleta y potencialmente podrían presentar actividades anti-patógenos virales. Desde que se identificaron en las plantas los AMPs, solamente se ha estudiado una pequeña fracción de ellos. Se desconoce la distribución, proporción y tipo de péptidos antimicrobianos que varían entre familias y especies. Gracias a la conformación de bases de datos donde se va almacenando cada nuevo descubrimiento, como ser su procedencia y actividad biológica, la información se hace más fácilmente disponible para el desarrollo de nuevas aplicaciones en el campo de la industria agrícola, farmacéutica y biotecnológica con el fin de mejorar la calidad de vida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, A.M., I.E. Francois, E.M. Meert, Q.T. Li, B.P. Cammue & K. Thevissen (2007) The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 243-7.
- Aerts, A.M., D. Carmona-Gutiérrez, S. Lefevre, G. Govaert, I.E. Francois, F. Madeo, et al. (2009) The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 583: 2513-6.
- Akkan, Y. (2016) A review of antifungal peptides: basis to new era of antifungal drugs. *Jordan J. Pharm. Sci.* 9: 51-75.
- Alenius, H., N. Kalkkinen, M. Lukka, T. Reunala, K. Turjanmaa, S. Makinen-Kiljunen, et al. (1995) Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin. Exp. Allergy.* 25: 659-65.
- Archer, B.L. (1960) The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. *Biochem. J.* 75: 236-40.
- Barbosa Pelegrini, P., R. Perseghini del Sarto, O. Nascimento Silva, O.L. Franco & M.F. Grossi-de-Sa (2011) Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochem. Res. Int.* 2011:1-9.
- Beintema, J.J. (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* 350: 159-63.
- Berrocal-Lobo, M., A. Segura, M. Moreno, G. López, F. Garcia-Olmedo & A. Molina (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128: 951-61.
- Blanco, C. (2003) Latex-fruit syndrome. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 47-53.
- Bulet, P., R. Stocklin & L. Menin (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 169-84.
- Cammue, B.P.A., M.F.C. De Bolle, F.R.G. Terras, P. Proost, J. Van Damme, S.B. Rees, et al. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-33.
- Campese, M., X. Sun, J.A. Bosch, F.G. Oppenheim & E.J. Helmerhorst (2009) Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch. Oral Biol.* 54: 345-53.

- Carvalho, A.O. & V.M. Gomes (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—a concise review. *Peptides* **28**: 1144–53.
- Carvalho, A.O. & V.M. Gomes (2009) Plant defensins: prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* **30**: 1007–20.
- Carvalho, A.O. & V.M. Gomes (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr. Pharm. Des.* **17**: 4270–93.
- Chen, K.C., C.Y. Lin, C.C. Kuan, H.Y. Sung & C.S. Chen (2002) A novel defensin encoded by a mung bean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7258–63.
- Conlon, J.M., A. Sonnevend, M. Patel, K. Al-Dhaheri, P.F. Nielsen, J. Kolodziejek, *et al.* (2004) A family of brevinin-2 peptides with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* from the skin of the Hokkaido frog, *Rana pirica*. *Regul. Pept.* **118**: 135–41.
- Conners, R., A.V. Konarev, J. Forsyth, A. Lovegrove, J. Marsh, T. Joseph-Horne, *et al.* (2007) An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of veronica (*Veronica hederifolia* L.). *J. Biol. Chem.* **282**: 27760–8.
- Craik, D.J. (2012) Host-defense activities of cyclotides. *Toxins (Basel)* **4**: 139–56.
- Daly, N.L., K.R. Gustafson & D.J. Craik (2004) The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1. *FEBS Lett.* **574**: 69–72.
- De, Coninck B., B.P.A. Cammue & K. Thevissen (2016) Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol. Rev.* **26**: 109–20.
- Díaz-Perales, A., C. Collada, C. Blanco, R. Sánchez-Monge, T. Carrillo, C. Aragoncillo, *et al.* (1998) Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**: 127–33.
- Duncan, V.M.S. & D.A. O’Neil (2013) Commercialization of antifungal peptides, *Fungal Biol. Rev.* **26**: 156–65.
- Duvick, J.P., T. Rood, A.G. Rao & D.R. Marshak (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* **267**: 18814–20.
- Evans, J., Y.D. Wang, K.P. Shaw & L.P. Vernon (1989) Cellular responses to pyrulariathionin are mediated by Ca<sup>2+</sup> influx and phospholipase A2 activation and are inhibited by thionin tyrosine iodination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 5849–53.
- Evet, G.E., D.M. Donaldson & L.P. Vernon (1986) Biological properties of *Pyrulariathionin* prepared from nuts of *Pyrularia pubera*. *Toxicon* **24**: 622–5.
- Florack, D.E.A., B. Visser, Ph.M. De Vries, J.W.L. Van Vuurde & W.J. Stiekema (1993) Analysis of the toxicity of purothionins and hordothionins for plant pathogenic bacteria. *Neth. J. Plant Path.* **99**: 259–68.
- Fox, J.L. (2013) Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat. Biotechnol.* **31**: 379–83.
- Fracki, W.S., D. Li, N. Owen, C. Perry, G.H. Naisbitt & L.P. Vernon (1992) Role of Tyr and Trp in membrane responses of pyrulariathionin determined by optical and NMR spectra following Tyr iodination and Trp modification. *Toxicon* **30**: 1427–40.
- Franco, O.L. (2011) Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. *FEBS Lett.* **585**: 995–1000.
- Fujimura, M., Y. Minami, K. Watanabe & K. Tadera (2003) Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, fa-amp1 and fa-amp2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1636–42.
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 710–20.
- Gausing, K. (1987) Thionin genes specifically expressed in barley leaves. *Planta* **171**: 241–6.
- Gould, A., Y. Ji, T.L. Aboye & J.A. Camarero (2011) Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **17**: 4294–307.
- Grobois, M., F. Guerbette, A. Jolliot, F. Quintin & J.C. Kader (1993) Control of maize lipid transfer protein activity by oxido-reducing conditions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1170**: 197–203.
- Gust, A., F. Brunner & T. Nürnberger (2010) Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 204–10.
- Gustafson, K.R., T.C. McKee, H.R. Bokesch (2004) Anti-HIV cyclotides. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**: 331–40.
- Hammami, R., B.J. Hamida, G. Vergoten & I. Fliss (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res.* **37**: 963–8.

- Harris, P.W.R., S.H. Yang, A. Molina, G. López, M. Middleditch & M.A. Brimble (2014) Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: Chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity. *Chem. Eur. J.* **20**: 5102-10.
- Heitz, A., O. Avrutina, D. Le-Nguyen, U. Diederichsen, J.F. Hernández, J. Gracy, *et al.* (2008) Knottin cyclization: Impact on structure and dynamics. *BMC Struct. Biol.* **8**: 1-19
- Henriques S.T. & D.J. Craik, Cyclotides as templates in drug design (2010) *Drug Discov. Today.* **15**: 57-64.
- Hernández-Lucas, C., R. Fernández de Caleyá & P. Carbonero (1974) Inhibition of brewer's yeasts by wheat purothionins. *Appl. Microbiol.* **28**:165-8.
- Hwang, B., J.S. Hwang, J. Lee & D.G. Lee (2010) Antifungal properties and mode of action of psacothiasin, a novel knottin type peptide derived from *Psacothea hilaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**: 352-7.
- Ireland, D.C., M.L. Colgrave & D.J. Craik (2006) A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: Sequence variation and the implications for structure, function and stability. *Biochem. J.* **400**: 1-12.
- IUPAC-IUB, Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984) Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. *Eur. J. Biochem.* **138**: 9-37.
- Kader, J.C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **47**: 627-54.
- Kanafani, Z.A. & J.R. Perfect (2008) Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**: 120-8.
- Kini, S.G., P.Q. Nguyen, S. Weissbach, A. Mallagaray, J. Shin, H.S. Yoon, *et al.* (2015) Studies on the chitin binding property of novel cysteine-rich peptides from *Alternanthera sessilis*. *Biochemistry* **54**: 6639-49.
- Kolmar, H. (2009) Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**: 608-14.
- Konarev, A.V., I.N. Anisimova, V.A. Gavrilova, T.E. Vachrusheva, G.Y. Konechnaya, M. Lewis, *et al.* (2002) Serine proteinase inhibitors in the compositae: Distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry* **59**: 279-91.
- Koo, J.C., S.Y. Lee, H.J. Chun, Y.H. Cheong, J.S. Choi, S. Kawabata, *et al.* (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**: 80-90.
- Koo, J.C., H.J. Chun, H.C. Park, M.C. Kim, Y.D. Koo, S.C. Koo, *et al.* (2002) Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **50**: 441-52.
- Kragh, K.M., J.E. Nielsen, K.K. Nielsen, S. Dreboldt & J.D. Mikkelsen (1995) Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 424-34.
- Lay, F.T., F. Brugliera & M.A. Anderson (2003) Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol.* **131**: 1283-93.
- Lee, J.Y., K. Min, H. Cha, D.H. Shin, K.Y. Hwang & S.W. Suh (1998) Rice non-specific lipid transfer protein: The 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J. Mol. Biol.* **276**: 437-48.
- Lohner, K., A. Latal, R.I. Lehrer & T. Ganz (1997) Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* **36**: 1525-31.
- López-Abarategui, C., A. Alba, O.N. Silva, O. Reyes-Acosta, I.M. Vasconcelos, J.T. Oliveira, *et al.* (2012) Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie* **94**: 968-74.
- Machado, A., M.A. Fazio, A. Miranda, S. Daffre & T.M. Machini (2012) Synthesis and properties of cyclic gomesin and analogues. *J. Pept. Sci.* **18**: 588-9.
- Mandal, S.M., L. Migliolo, O.L. Franco & A.K. Ghosh (2011) Identification of an antifungal peptide from *Trapanatans* fruits with inhibitory effects on *Candida tropicalis* biofilm formation. *Peptides* **32**:1741-7.
- Marcus, J.P., J.L. Green, K.C. Goulter & J.M. Manners (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7s globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J.* **19**: 699-710.
- Méndez, E., A. Rocher, M. Calero, T. Girbes, L. Citores & F. Soriano (1996) Primary structure of -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* **239**: 67-73.
- Milbradt, A.G., F. Kerek, L. Moroder & C. Renner (2003) Structural characterization of hellethionins from *Helleborus purpurascens*. *Biochemistry* **42**: 2404-11.



- Molina, A., P.A. Goy, A. Fraile, R. Sánchez-Monge & F. García-Olmedo (1993a) Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Sci.* **92**: 169-77.
- Molina, A., A. Segura & F. García-Olmedo (1993b) Lipid transfer proteins (nsLtps) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* **316**: 119-22.
- Nagant, C., B. Pitts, K. Nazmi, M. Vandenbranden, J.G. Bolscher, P.S. Stewart, *et al.* (2012) Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5698-708.
- Nawrot, R., J. Barylski, G. Nowicki, J. Broniarczyk, W. Buchwald & A. Goździcka-Józefiak (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* **59**:181-96.
- Ng, Y.M., Y. Yang, K.H. Sze, X. Zhang, Y.T. Zheng & P.C. Shaw (2011) Structural characterization and anti-hiv-1 activities of arginine/glutamate-rich polypeptide luffin p1 from the seeds of sponge gourd (*Luffa cylindrica*). *J. Struct. Biol.* **174**: 164-72.
- Nikawa, H., H. Fukushima, S. Makihira, T. Hamada & L.P. Samaranayake (2004) Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis.* **10**: 221-8.
- Oliveira-Lima, M., A.M. Benko-Iseppon, J.R.C.F. Neto, S. Rodríguez-Decuadro, E.A. Kido, S. Crovella, *et al.* (2017) Snakin: Structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide. *Curr. Protein Pept. Sci.* **18**: 368-74.
- Oparin, P.B., K.S. Mineev, Y.E. Dunaevsky, A.S. Arseniev, M.A. Belozersky, E.V. Grishin, *et al.* (2009) Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides. *Biochem. J.* **446**: 69-77.
- Pal, T., B. Abraham, A. Sonnevend, P. Jumaa & J.M. Conlon (2006) Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad-spectrum antibacterial and antifungal properties. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**: 525-9.
- Pallaghy, P.K., K.J. Nielsen, D.J. Craik & R.S. Norton (1994) A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* **3**: 1833-9.
- Park, Y., D.G. Lee & K.S. Hahm (2004) HP(2-9)-magainin 2(1-12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. *J. Pept. Sci.* **10**: 204-9.
- Park, C. & D.G. Lee (2009) Fungicidal effect of antimicrobial peptide arenicin-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**: 1790-6.
- Pato, C., M. Le Borgne, G. Le Baut, P. Le Pape, D. Marion & J.P. Douliez (2001) Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 555-60.
- Pelegri, P.B. & O.L. Franco (2005) Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 2239-53.
- Pfaller, M.A. (2012) Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* **125**: S3-S13.
- Pons, J.L., F. de Lamotte, M.F. Gautier & M.A. Delsuc (2003) Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 14249-56.
- Porto, W.F. & O.L. Franco (2013) Theoretical structural insights into the snakin/gasa family. *Peptides* **44**: 163-7.
- Pushpanathan, M., J. Rajendhran, S. Jayashree, B. Sundarakrishnan, S. Jayachandran & P. Gunasekaran (2012) Identification of a novel antifungal peptide with chitin binding property from marine metagenome. *Protein Pept. Lett.* **19**: 1289-96.
- Raikhel, N.V. & H.I. Lee (1993) Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 591-615.
- Rees, D.C. & W.N. Lipscomb (1982) Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **160**: 475-98.
- Regente, M.C., A.M. Giudici, J. Villalain & L. de la Canal (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letts. Appl. Microbiol.* **40**: 183-9.
- Rossi, D.C., J.E. Muñoz, D.D. Carvalho, R. Belmonte, B. Faintuch, P. Borelli, *et al.* (2012) Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurriago mesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiol.* **12**: 28.
- Rosignol, T., B. Kelly, C. Dobson & C. d'Enfert, C. (2011) Endocytosis mediated vacuolar accumulation of the human ApoE Apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 4670-81.

- Salas, C.E., J.A. Badillo-Corona, G. Ramírez-Sotelo & C. Oliver-Salvador (2015) Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *Biomed. Res. Int.* **2015**: Article ID 102129.
- Samriti, R. Biswas & K. Biswas (2018) Plant antimicrobial peptides: a novel approach against drug resistant microorganisms. *IJPSR* **9**: 1-15.
- Segura, A., M. Moreno, F. Madueno, A. Molina & F. García-Olmedo (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **12**: 16-23.
- Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2883-94.
- Shin, D.H., J.Y. Lee, K.Y. Hwang, K.K. Kim & S.W. Su (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* **3**: 189-99.
- Silverstein, K.A.T., W.A. Moskal Jr., H.C. Wu, B.A. Underwood, M.A. Graham, C.D. Town, *et al.* (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* **51**: 262-80.
- Simorre, J., A. Caille, M. Dominique, M. Didier & M. Ptak (1991) Two- and three-dimensional <sup>1</sup>H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. *Biochemistry* **30**: 11600-8.
- Sitaram, N. (2006) Antimicrobial peptides with unusual amino acid compositions and unusual structures. *Curr. Med. Chem.* **13**: 679-96.
- Slavokhotova, A.A., T.A. Naumann, N.P.J. Price, E.A. Rogozhin, Y.A. Andreev, A.A. Vassilevski, *et al.* (2014) Novel mode of action of plant defense peptides - hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases. *FEBS J.* **281**: 4754-64.
- Slavokhotova, A.A., A.A. Shelenkov, T.V. Korostyleva, E.A. Rogozhin, N.V. Melnikova, A.V. Kudryavtseva, *et al.* (2017) Defense peptide repertoire of *Stellaria media* predicted by high throughput next generation sequencing. *Biochimie* **135**: 15-27.
- Soliman, W., L. Wang, S. Bhattacharjee & K. Kaurt. (2011) Structure-activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin S from two peptide class IIb bacteriocins. *J. Med. Chem.* **54**: 2399-408.
- Sonthei, M., M. Toubiana, A. Pallavicini, P. Venier & P. Roch (2011) Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide mytimycin (MytM) from the mediterranean mussel, *Mytilus gallo provincialis*. *Mar. Biotechnol.* **13**: 857-67.
- Soscia, S.J., J.E. Kirby, K.J. Washicosky, S.M. Tucker, M. Ingelsson, B. Hyman, *et al.* (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide. *Plos One* **5**: e9505.
- Stec, B., O. Markman, U. Rao, G. Heffron, S. Henderson, L.P. Vernon, *et al.* (2004) Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J. Pept. Res.* **64**: 210-24.
- Stec, B. (2006) Plant thionins - the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 1370-85.
- Steinmuller, K., A. Batschauer & K. Apel (1986) Tissue-specific and light-dependent changes of chromatin organization in barley (*Hordeum vulgare*). *Eur. J. Biochem.* **158**: 519-25.
- Tam, J.P., S. Wang, K.H. Wong & W.L. Tan (2015) Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals* **8**: 711-57.
- Tavormina, P., B. De Coninck, N. Nikonorova, I. De Smet & B.P.A. Cammue (2015) The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions. *Plant Cell* **27**: 2095-118.
- Terras, F.R.G., H.M.E. Schoofs, M.F.C. De Bolle, F. Van Leuven, S.B. Rees, J. Van der Leyden, *et al.* (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **267**: 15301-9.
- Terras, F.R.G., K. Eggermont, V. Kovaleva, N.V. Raikhel, R.W. Osborn, A. Kester, *et al.* (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* **7**: 573-88.
- Thevissen, K., F.R.G. Terras & W.F. Broekaert (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5451-8.
- Thevissen, K., B.P.A. Cammue, K. Lemaire, J. Winderickx, R.C. Dickson, R. Lester, *et al.* (2000) A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9531-6.
- Utkina, L.L., Y.A. Andreev, E.A. Rogozhin, T.V. Korostyleva, A.A. Slavokhotova, P.B. Oparin, *et al.* (2013) Genes encoding 4-cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharaedorof*. Et migush.: Multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. *FEBS J.* **280**: 3594-608.

- Van Parijs, J., W.F. Broekaert, I.J. Goldstein & W.J. Peumans (1991) Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-64.
- Wang, C.K., M.L. Colgrave, K.R. Gustafson, D.C. Ireland, U. Goransson & D.J. Craik (2008) Anti-HIV cyclotides from the chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. *J. Nat. Prod.* **71**: 47-52.
- Wijaya, R., G.M. Neumann, R. Condrón, A.B. Hughes & G.M. Polya (2000) Defense proteins from seed of cassia fistula include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* **159**: 243–55.
- Wong, C.T.T., D.K. Rowlands, C.H. Wong, T.W.C. Lo, G.K.T. Nguyen, H.Y. Li, *et al.* (2012) Orally active peptidic bradykinin b1 receptor antagonists engineered from a cyclotide scaffold for inflammatory pain treatment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**: 5620-4.
- Wong, K.H., W.L. Tan, A. Serra, T. Xiao, S.K. Sze, D. Yang, *et al.* (2016) Ginkgotides: Proline-rich hevein-like peptides from gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Front. Plant Sci.* **7**: 1-15.
- Wong, K.H., W.L. Tan, S.G. Kini, T. Xiao, A. Serra, S.K. Sze, *et al.* (2017) Vaccatides: antifungal glutamine-rich hevein-like peptides from *Vaccaria hispanica*. *Front. Plant Sci.* **8**: 1-14.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**: 389-95.
- Zhai, B. & L. Xiaorong (2011) Recent progress on antifungal drug development. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**: 1255-62.
- Zhang, Z. & S. Zhu (2010) Functional role of charged residues in drosomycin, a *Drosophila* antifungal peptide. *Dev. Comp. Immunol.* **34**: 953-8.
- Zottich, U., M. Da Cunha, A.O. Carvalho, G.B. Dias, N.C. Silva, I.S. Santos, *et al.* (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with  $\alpha$ -amylase inhibitor properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**: 375-83.