

**OTKA ny. szám: F-043192**

**Vezető kutató: Dr. Mátyus Edit**

## **Zárójelentés**

### **Az „*Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* által termelt lipopeptidek és a sejtmembrán közötti kölcsönhatások vizsgálata” című fiatal kutatói ösztöndíj munkáról**

A gombás fertőzések megbetegedések számának és súlyosságának fokozódása, a rendelkezésre álló antifungális gyógyszerek nem kielégítő hatékonysága és szűk hatásspektruma, valamint toxikus mellékhatásai és a velük szemben gyorsan kialakuló rezisztencia miatt, új antifungális vegyületek kutatása ma is a gyógyszerkutatás egyik kiemelten fontos területe [1].

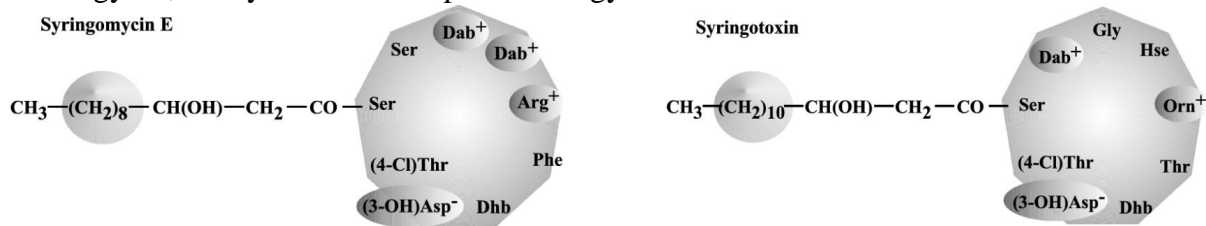
A *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* növényi kórokozó baktérium törzs ciklusos lipopeptideket (CLPs) termel, amelyek különböző gombafajokra (pl. *Candida* fajra, *Cryptococcus neoformans*) széles spektrumú gombaölő aktivitást fejtenek ki. Elsődleges célpontjuk a plazma membrán, ahova beépülve pórust alakítanak ki, megváltoztatva annak működését, mint az ion fluxust, a membrán potenciált és a  $K^+H^+$ -ATP aktivitást. Biológiai aktivitásukat az ismert antifungális vegyületektől eltérő mechanizmus szerint fejtik ki, amelyről egyelőre csak részleteket ismerünk. A pórus kialakításában hat, illetve három CLP molekula vesz részt, amelyet a lipid molekulák stabilizálnak [6]. Az anion szelektív pórus mérete a CLP természetének függvénye. Az eltérő hatásspektrum, antimikrobiális és patogén aktivitás, szerkezeti különbözőségük függvénye, ezért a CLP molekulák szerkezetének molekuláris szintű megismerése várhatóan közelebb visz biológiai aktivitásuk megértéséhez.

Az OTKA projekt keretében három, különböző szerkezetű és biológiai aktivitású, antifungális ciklusos lipopeptid, a syringomycin-E (SR-E), a syringotoxin (ST-B) és a syringopeptin-25A (SP-25A) vegyület, hatásmechanizmusát vizsgáltuk molekula dinamikai szimulációval. A projektet három lépésbe valósítottuk meg: a CLP molekulák háromdimenziós szerkezetének meghatározását és jellemzését hidrofil és hidrofób közegben a sejtmembránt modellező lipid kettősrétegek megépítése követte, majd a peptid-lipid rendszerek összeépítését és hosszú távú molekula dinamikai szimulációját végeztük el.

A projekt első két évében a három CLP molekula hidrofil és hidrofób közegben kialakuló háromdimenziós (3D) szerkezetét és azok sajátosságait határoztuk meg. A molekula dinamikai számításokat az első évben az Accelrys programcsomaggal végeztük. A GROMACS programcsomag megismerésével azonban nyilvánvalóvá vált, hogy peptid-lipid kölcsönhatások atomi szintű vizsgálatához ez a módszer alkalmasabb, így a további szimulációhoz ezt a programcsomagot használtuk.

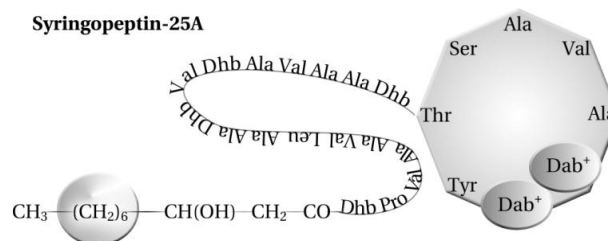
A SR-E és a ST-B molekulák a nonapeptid csoportjában tartoznak, míg a SP-25A a syringopeptidek családjának egyik képviselője (1. Ábra). A CLP molekulák kiindulási elsődleges szerkezetét az experimentális irodalmi adatokból (NMR és sztereokémiai vizsgálatok) ismert abszolút konfiguráció alapján építettük fel [2, 4]. Az SR-E molekula

kilenc aminosavja három pozitív és egy negatív töltésű lakton gyűrűt alkot, amelyhez egy 3-hidroxi zsírsav kapcsolódik. Az ST-B molekula két pozitív és egy negatív töltésű nonapeptid lakton gyűrű, amelyhez szintén kapcsolódik egy 3-hidroxi zsírsav.



1. Ábra. A nonapeptide molekulák primér szerkezet.

A 25 aminosavból felépülő SP-25A molekula nyolc aminosavja alkotja a két pozitív töltésű lakton gyűrűt, amelyhez egy tizenhét aminosavból álló hidrofób peptid rész kapcsolódik, amely egy 3-hidroxi zsírsavban végződik (1 Ábra).



2. Ábra. A syringopeptin-25A elsődleges szerkezet.

Mindhárom CLP molekula szerkezetét a jól ismert aminosavak mellett, speciális aminosavak, mint például a 2,3-dehidro-2-aminobuténsav (Dhb) is alkotják. A molekulák további sajátja, hogy a szerin aminosav lakton kötést alakít ki a threonin aminosavval, zárva a lakton gyűrűt. Ez az aminosav és ez a speciális lakton kötés az alkalmazott ffgmx2 erőterben (Gromacs program) nem definiált, ezért ezen aminosav fragmentjein (3. Ábra.) HF szinten geometriai optimalizálást és kvantum mechanikai (QM) számolást végeztünk Gaussian 98 programot alkalmazva.



3. Ábra: A QM számolásnál alkalmazott Dhb aminosav és a lakton kötetést kialakító aminosavak molekula fragmentjei.

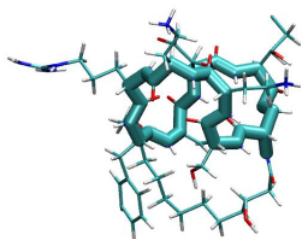
A QM számolás eredményeként optimalizált kötéstávolságokkal és kötésszögekkel kiegészített ffgmx2 erőteret használtuk a további molekula dinamikai számolások elvégzéséhez [3].

A CLP molekulák modelljét vizes és oktán közegbe szolvatáltuk, a határfeltételeknek megfelelő periodikus dobozba helyezve. A minimalizált szerkezeteket ('steepest descent' módszer) azonos protokoll szerint 200 ns MD-vel szimuláltuk. Hidrofil közegben az MD modellezést geometriai korlátozó paraméterek nélkül, illetve SR-E és a SP-25A esetében NOE NMR mérések alapján becsült korlátozó paraméterekkel is kiviteleztek. A SR-E vegyületen az NMR méréseket a Debreceni Egyetemen Dr. Kövér Katalin végezte. Az SP-25A molekula esetében az irodalomból ismert adatokkal dolgoztunk. Az oktán rendszer esetében korlátozó paraméterek nélküli MD számolást kiviteleztek. A hidrofil és hidrofób rendszerekre jellemző konformerek meghatározásához és jellemzéséhez a trajektóriákon (az atomok térkoordinátái az idő függvényében képezik a rendszer trajektóriáját) RMSD, klaszter-, sóhid-, hidrogénkötés,  $\psi$  és  $\phi$  szög analízist, a molekula, illetve a molekulaváz sugarának változását és a molekula fluktuációjára vonatkozó vizsgálatokat végeztünk.

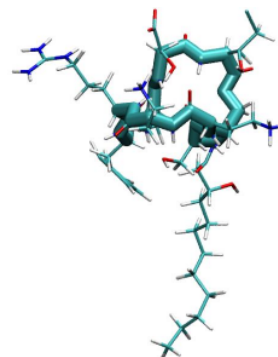
#### ***Az SR-E rendszereken végzett szimuláció eredményei***

A korlátozott rendszer trajektóriájának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a kísérleti mérésekkel meghatározott geometriai korlátok, a kísérleti NOE adatok, teljes szimuláció alatt fenntarthatók, és az elsődleges szerkezetbe jól beépíthetők. Mivel a mért és az MD számolás alapján meghatározott NOE adatok igen jó egyezésbe vannak, megállapítottuk hogy a hosszú távú MD szimuláció alkalmas a SR-E molekula 3D szerkezetének leírására.

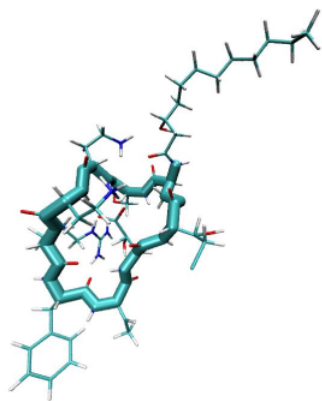
A SR-E rendszerek trajektóriájára két-két átlagolt közép szerkezet a jellemző, az ún. 'zárt' és 'nyitott' konformerek. Azonban míg a vizes közegben a 'zárt' konformer (**A**) a teljes trajektória 81% -ban, a 'nyitott' konformer (**B**) 13%-ban fordul elő, addig az oktán közegben a 'nyitott' konformer (**C**) a dominánsabb ('nyitott' konformer 50%, 'zárt' konformer (**D**) 30% a teljes populációnak) (4. Ábra). Az alkil lánc helyzetében különböző konformerek előfordulási valószínűsége az oldószer polaritásának függvénye, összhangban az irodalomból ismert kísérleti eredményekkel.



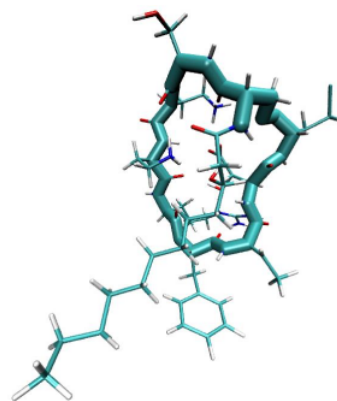
**A: 'zárt' konformer**



**B: 'nyitott' konformer**



**C: 'nyitott' konformer**



**D: 'zárt' konformer**

4. Ábra. A SR-E domináns konformerei: A, B vizes, C, D oktán közegben

Hidrofil és hidrofób közegben a SR-E molekula szerkezetének stabilitását a Phe, Dhb, Asp aminosavak eltérően alakítják. Az **A** konformer esetében az Asp és az Arg aminosavak között kialakuló hidrogénkötés és sóhid stabilizálja a szerkezetet, ami a **B** konformer esetében nem tapasztalható. A hidrofób közegben az Asp és Arg aminosavak igen távol helyezkednek el, hogy intramolekuláris hidrogénkötést alakítsanak ki, azonban töltéssel rendelkező oldalláncaik között sóhid alakul ki.

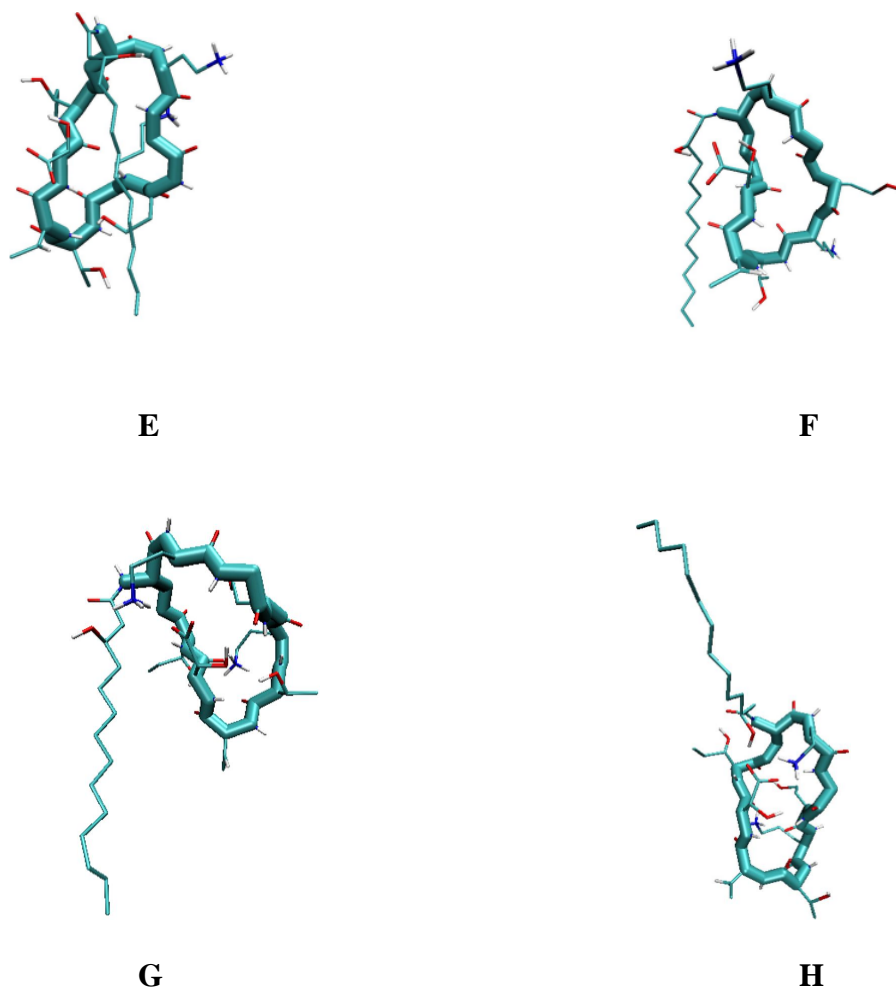
A CD spektroszkópiai mérések a Dhb/Phe aminosavak között hidrofób kölcsönhatást valószínűsítettek, ami a közeg polaritásának a függvényében változott. MD szimulációval ezt a kölcsönhatás változást igazoltuk: a fenil-gyűrű és a Dhb aminosav oldallánca közötti távolság a teljes szimuláció alatt 0.75 nm-ről 0.5 nm-re, illetve 3.5 nm-ről 1 nm-re nm csökken hidrofil, illetve hidrofób közegekben.

A kísérleti eredmények alapján Vallio és mkt. feltételezte, hogy a lakton gyűrűre ráhajló alkil lánc, azzal hidrogén-kötést kialakítva, stabilizálja a molekula szerkezetét. Ez hidrofil közegben nem tapasztalható, azonban hidrofób közegben az alkil lánc OH csoportja a Dab4 (2,4-diaminobutánsav) amino csoportjával hidrogén kötést hoz létre, stabilizálva a molekulát. A másik jellemző különbség, a hidrofób és hidrofil közegben kialakuló konformerek szerkezetében, hogy a **C** és a **D** konformerek vázában torzult II  $\beta$ -típusú csavar szerkezet alakul ki, ahol a Phe és a Dhb a központi aminosavak. Ennek a szerkezeti jellemzőnek a kialakulását a dehidrofenilalanin és dehidroleucin modell peptidekkel végzett kísérletek [4] alapján előre valószínűsítették.

#### ***A ST rendszereken végzett vizsgálatok eredményei:***

A vizsgált ST-B molekula szerkezete csupán három aminosavban tér el a SR-E molekula szerkezetétől, így várható, hogy 3D szerkezeti sajátosságaik igen hasonlóak. Mivel azonban a különböző töltésnek és hidrofóbicitásnak meghatározó szerepe van a CLP molekulák biológiai aktivitásában, ezért a ST-B szerkezetének molekuláris szintű jellemzését is fontosnak tartottuk.

A ST-B hidrofil rendszer trajektóriáját az **E** 'zárt' konformer (teljes populáció 60%-a) és az **F** 'nyitott' konformer (a teljes populáció 17%-a) jellemzi, míg a hidrofób közegben a 'zárt' konformer igen domináns, a teljes trajektória 95 %-ban, addig a 'nyitott' konformer csupán 5%-ban van jelen (5. Ábra).



5. Ábra. Az ST-B molekula átlagolt közép szerkezete hidrofil, illetve hidrofób közegben

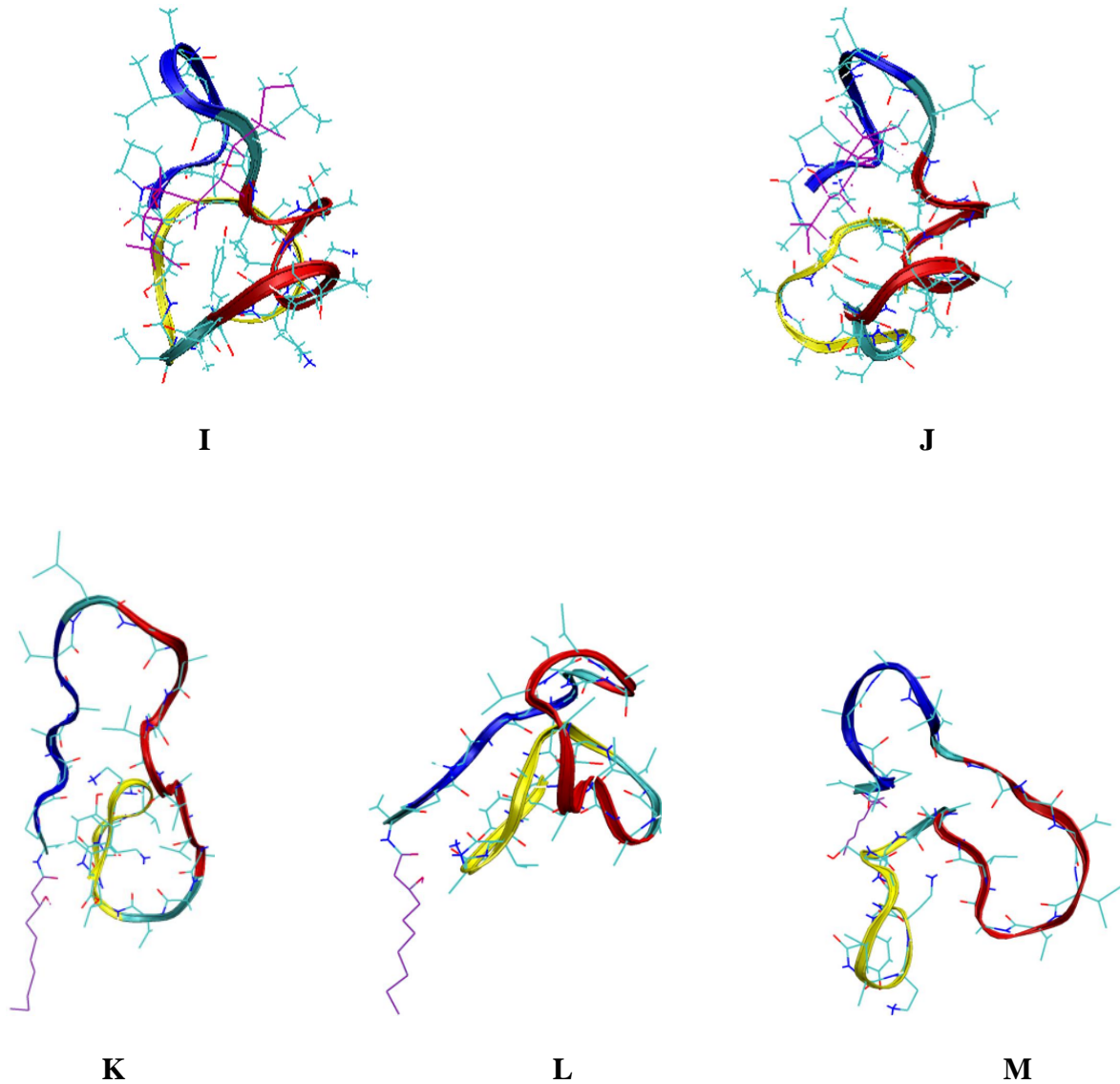
Az ST-B molekula szerkezetét az Orn, Asp és Dab aminosavak között kialakuló kölcsönhatás stabilizálja. Az **E** és **G** konformereknél az Asp és az Orn, míg az **F** és **H** konformereknél az Asp és Dab aminosavak között hidrogénkötés alakul ki. Az konformereknél, az **E** konformer kivételével, Asp és a Dab aminosavak sóhidat képeznek.

Az **E** és **F** konformereknél III  $\beta$ -csavar (Orn5-Asp8), míg a **G** és **H** konformereknél  $\gamma$ -csavar (Thr6 és Asp8) alakul ki. A csavar szerkezetek jelenléte miatt Ballio a lakton gyűrű alakját teniszlabdához hasonlította [2].

#### ***A SP-25A rendszereken végzett vizsgálatok eredményei:***

A hidrofil rendszerben szolvatált SP-25A molekula teljes trajektóriáját két, míg a hidrofób közegben három átlagolt közép szerkezet jellemzi (6. Ábra). A molekula háromdimenziós szerkezetét a nagyszámú Dhb és Ala aminosav jelenléte alakítja, amelyek a molekula rigiditását, illetve a helix tartomány kialakulását eredményezik. A váltakozó heterokiralitás a  $\beta$  és a  $\gamma$  csavarok kialakulását proponálja. A konformerek három szerkezeti egységre tagolhatók: a kettőtől hatig terjedő aminosavak a hurkot, nyolctól tizenötig a hélixet

és a tizennyolctól huszonötig a lakton gyűrűt alkotják. A hosszú aminosav lánchoz egy hidrofób alkil lánc kapcsolódik, ami nem része egyik szerkezeti egységnek sem. A hurok szerkezetét, a váltakozó kiralitás eredményeként,  $\gamma$ -, illetve  $\beta$ -csavar szerkezet határozza meg mind a vizes mind az oktán közegben (5. Ábra.).



6. Ábra. Az SP-25A domináns konformerei: I, J vizes, K, L, M oktán közegben

A kísérleti vizsgálatok alapján a hélix-tartomány stabilitását négy hidrogén kötés kialakulásának tulajdonították, amiből vákuumban végzett szimulációval hármat sikerült azonosítani [2]. A hidrofób és hidrofil közegben kialakuló SP-25A átlagolt közép szerkezetnél, különböző gyakorisággal, mind a négy hidrogén kötést azonosítottuk. A harmadik szerkezeti egységben, a lakton gyűrűben, három csavar létezését várták, de csak kettőt sikerült azonosítani. A hidrofil és hidrofób közegben végzett hosszú MD szimuláció eredményeként a hiányzó csavar (19-es és a 22-es aminosav között) kialakulása megfigyelhető.



Az első kétévi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a szimulációs számítások alapján javasolt konformerek szerkezete összhangban van a kísérleti eredmények alapján valószínűsített szerkezetekkel. Az MD szimuláció alkalmas a CLP rendszerek molekuláris szintű vizsgálatára. Az MD szimuláció eredményeként hidofil és a hidrofób közegben legnagyobb valószínűséggel előforduló konformereket építettük be a különböző típusú és összetételű lipid kettősrétegekbe, hogy a peptid-lipid kölcsönhatást molekuláris szinten értelmezhesük.

A projekt harmadik évében, a GROMACS szimulációs programcsomaggal, a különböző méretű és összetételű lipid kettősrétegeket építettük fel. A lipid kettősrétegek méretét és összetételét, az Intézetünkben a CLP molekulákon végzett kísérletek [5], illetve az irodalomból ismert [6] kísérletek eredményeinek figyelembevételével határoztuk meg. Ismert, hogy egy pórust hat SR-E vagy ST-B, illetve három SP-25A molekula hozza létre, úgy, hogy egy peptid molekula mellett negyven lipid molekula is része a kialakuló pórusnak. A pórus kialakulása szignifikánsan függ a lipid kettősréteg szerkezetétől és töltésétől.

A lipid molekulák a pórus kialakulásában betöltött szerepének vizsgálatához DOPE, DOPS és különböző összetételű (1:1, 1:3, 3:1) DOPE/DOPS lipid kettősrétegeket szerkesztettünk. A peptid:lipid arányt, illetve a lipid:víz arányt a kísérletek alapján meghatározott 1:40-nek választottuk. Az 50000-55000 atomot tartalmazó rendszereket 3-5 ns molekula dinamikai szimulációval egyensúlyi állapotba hoztuk. A trajektóriák kiértékelése után megállapítottuk, hogy az egyensúlyban lévő kettősrétegek alkalmasak, a peptid molekulákkal összeépítve, további molekula dinamikai szimulációs vizsgálatok elvégzésére.

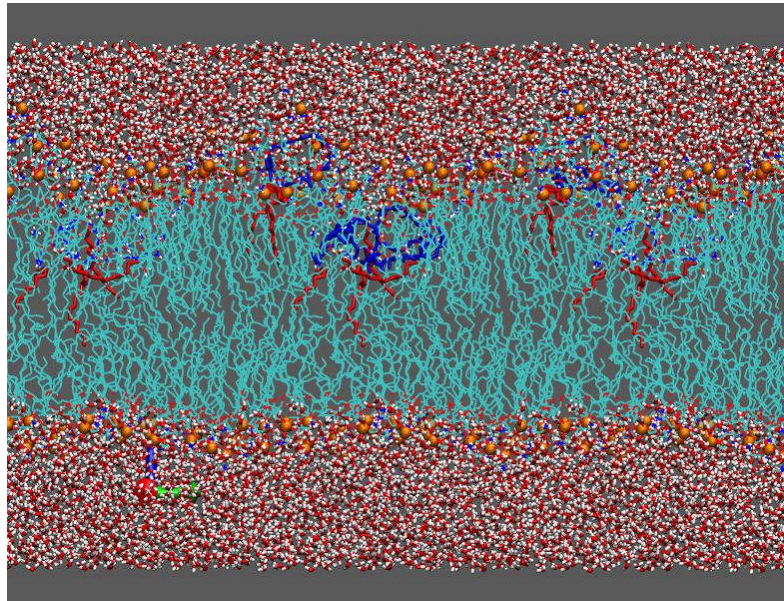
A lipid kettősrétegek megszerkesztésének folyamata és MD szimulációja önmagában nem leközölhető eredmény, de az egyensúlyban lévő rendszerek várhatóan egy adatbázisba bekerülve mások által is alkalmazhatóvá válhatnak.

A negyedik évben a CLP molekulák és a lipid kettősréteg összeépítését a peptid molekulák a kettősréteg középpontjához viszonyított kiindulási helyzetének meghatározása előzte meg. Az irodalomból ismert, hogy feltehetően a peptidek poláros része a lipid/víz határfelület közelében tartózkodik, míg az apoláris alkilánc belenyúlik a hidrofób részbe. A feltételezett 'ideális' helyzet meghatározásához kisebb méretű, 72 lipid molekulából álló kettősrétegeket szerkesztettünk (a lipid:víz arányt nem módosítottuk), így szimulációs időt lerövidítettünk. A trajektóriák kiértékelése után a peptidek 'ideális' helyzetét számszerűsítettük. Továbbá, azt is megállapíthattuk, hogy amennyiben a peptidet az 'ideálistól' eltérő mélységbe helyezük, az alkilánc ráhajlik a peptid lakton gyűrűjére, és a teljes szimuláció alatt helyzetét megtartja.

Tíz CLP-lipid rendszert építettünk fel ahol a hat illetve a három CLP molekula tömegközéppontját a megfelelő mélységbe úgy helyeztük el, hogy a peptidek közötti kölcsönhatás kialakulhasson. Mivel ezek a peptid-lipid rendszerek igen nagyszámú atomot tartalmaznak, így atomi szintű MD szimulációja igen időigényes. A peptid-lipid rendszereken végzett számítások jelenleg is folyamatban vannak, a trajektóriák kiértékelését folyamatosan végezzük.

Ebben a jelentésben a hat SRE-DOPE rendszer 50 ns MD szimulációjának eredményeit ismertetem. A két sorban egymástól 2-2 nm-re elhelyezett SR-E molekulák ~ 5ns után kettésével aggregálódnak és alkil láncukat mélyen a hidrofób részbe nyújtják (7. Ábra.). Lipid környezetben a lakton gyűrűk síkja és a kettősréteg xy síkja által bezárt szög megnövekedik, tehát a lakton gyűrű síkja nem párhuzamos a kettősréteg xy síkjával, ahogy azt a kísérletek alapján feltételezték. A peptid-lipid rendszerrel nem csupán a peptidek szerkezete változik meg, a peptidek is szignifikánsan megváltoztatják a lipidek rendezettségét. Minden peptid molekula lakton gyűrűje közvetlen kölcsönhatásba van 5-6 lipid molekulával, maga köré

rendezve azokat, illetve az első lipid réteg további 2-3 lipid molekula helyzetét determinálja. A sík lipid felület egy nyereghez hasonló alakzatot vesz fel, és a második SR-E molekula (B) környezetében megnyílik, azonban a pórus kialakulása 50 ns szimuláció után nem detektálható. Továbbá, az is megfigyelhető, hogy a peptidok a trans lipid oldal szerkezetét is megváltoztatják. A SR-E peptidhez hasonló szerkezetű magainin peptid által kialakított pórus szimulációs időtartama 250 ns [7], ezért várhatóan az általunk vizsgált antifungális peptiden is hasonló időtartamú szimuláció szükséges. Azonban már az eddigi vizsgálatokból is megállapítható, hogy a peptidok mellett a lipidek is részt vesznek a várhatóan kialakuló ún. 'lipidic' pórus kialakulásában.



7. Ábra. SR-E és a DOPE rendszer ~50 ns MD szimuláció után

A négy év eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy meghatároztuk és jellemeztük a három CLP molekula 3D szerkezetét hidofil és hidrofób közegben atomi szintű MD szimulációval. Megszerkesztettük a sejtmembránt modellező különböző összetételű lipid kettősrétegeket és egyensúlyi helyzetbe hoztuk. Továbbá, összeépítettük a különböző összetételű és méretű peptid-lipid kettősréteg rendszereket, amelyeken hosszú távú MD szimulációt végeztünk. Megállapítottuk, hogy a peptid-lipid kölcsönhatás eredményeként a peptidok maguk köré rendezve a lipid molekulákat, drasztikusan megváltoztatják annak szerkezetét, amely a második peptid környezetében megnyílik, azonban a pórus még nem alakul ki, ehhez hosszabb szimulációs idő szükséges.

Ez a projekt egy OTKA posztdoktori ösztöndíj keretében tovább folytatódik, így módunkban áll a peptid szerkezeti változása, a lipid kettősréteg rendezettségének megállapítása mellett a várhatóan kialakuló pórus szerkezetének és mechanizmusának az értelmezése.



- 
- [1] V.M. Gomes, A.O. Carvalho, M. Da Cunha, M.N. Keller, C. Bloch, P. Deolindo, E.W. Alves, Purification and characterization of novel peptide with antifungal activity from, *Bothrops jararaca* venom, *Toxicon*, 45, 817-827, (2005).
- [2] A. Ballio, A. Collina, A Di Nola, C. Manetti, m. Paci, A. Segre, Determination of structure and conformation in solution of syringotoxin, a lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* by 2D NMR and molecular dynamics, *Structural Chemistry*, 5, 1 (1994).
- [3 ] **E. Mátyus**, L. Monticelli, K. E. Kövér, Z. Xu, K. Blaskó, J. Fidy, D.P. Tieleman, Structural investigation of syringomycin-E using molecular dynamics simulation and NMR, *Eur. Biophys. J.* 249, 53 (2006).
- [4] E. Vaillo, A. Ballio, P.L. Luigi, R.M. Thomas The spectroscopic properties of the lipodepsipeptide, syringomycin E, *Biopolymers*, 32, 1317-1326 (1992).
- [5] Zs. Szabó, P. Gróf, L. V. Schagina, P. A. Gurnev, J. Y. Takemoto, **E. Mátyus**, K. Blaskó: Syringotoxin pore formation and inactivation in human red blood cell and model bilayer lipid membranes, *Biobhimica et Biophysyca Acta*, 1567, 143-149, (2002).
- [6] V.V. Malev, L.V. Schagina, P.A. Gurnev, J.Y. Takemoto, E. M. Nestorovich, S.M. Bezrukov, Syringomycin-E channel: A Lipidic pore stabilized by lipopetide?, *Biophys. J.* 82 (2002).
- [7] H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink, Antimicrobial peptides in action, *JACS*, 128, 12156 (2006).