

ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusának vizsgálata szilárd fázisú mágneses magrezonancia spektroszkópiával

A téma száma: F-68326

A munka kezdete és befejezése: 2007. július 1. - 2010. június 30.

1. LABORATÓRIUMI HÁTTÉR, SZEMÉLYI KÉRDÉSEK

A vizsgálatokat az MTA Kémiai Kutatóközpont NMR Laboratóriumában rendelkezésre álló 600 MHz-es *Varian NMR SYSTEM*TM spektrométeren végeztük.

Az izotópjelzett peptidek szintézise és tisztítása egy az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjával korábban kialakult együttműködés keretében, Dr. Bánóczy Zoltán közreműködésével történt. Az NMR spektroszkópiai vizsgálatokba laboratóriumunkban bekapcsolódott Király Péter Ph.D. hallgató. Az üveglapokon orientált lipid kettősrétegekben végzett méréseket együttműködésben végeztük a karlsruhe-i egyetem NMR csoportjával (Dr. Stephan Grage). A DSC vizsgálatokért köszönet illeti Dr. Varga Zoltánt és Dr. Bóta Attilát (MTA KK, Biológiai Nanokémia Osztály).

2. A PÁLYÁZAT TÉMÁJÁBAN ELÉRT EREDMÉNYEK

Az antimikrobiális peptidek (AMP) [1-4] rövid, gének által kódolt aminosavláncok, amelyek a kórokozók sejtmembránjában ioncsatornákat, pórusokat képezve növelik a sejtmembrán átjárhatóságát, ami a sejt plazma és az extracelluláris tér közötti elektromos potenciálkülönbség felborulását, illetve - magasabb koncentrációban - a membrán destabilizálódását eredményezi. Hatásmechanizmusuk fizikai, a hagyományos antibiotikumokétól eltérő jellege értékes és ígéretes célponttá teszi őket a gyógyszerkutatás számára. Pályázatom célja a maximin 4 nevű, 27 aminosavból álló (GIGGVLLSAGKAALKGLAKVLAEKYAN-NH₂), baktériumsejtek iránt nagyfokú szelektivitást mutató peptid [5] hatásmechanizmusának vizsgálata volt különböző membrán-mimetikus rendszerekben. A vizsgálatok elsősorban szilárd fázisú mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiai [6-9] módszerekkel történtek, amelyek lehetővé tették a peptid tanulmányozását a fiziológiás körülményeket megközelítő lipid kettősrétegekben. Az így nyert észrevételeinket később összevetettük a peptiden micellás és metanolos oldatban végzett folyadék NMR mérésekkel [10]. A kutatás négy fő területre összpontosult, amelyeket az alábbiakban összegezek.

2.1. A peptidláncok másodlagos szerkezetének meghatározása a membránban

A) Vizsgálatok lipid kettősrétegekben

Vizsgálataink alapjául az irodalomból ismeretes tapasztalati tény szolgált, mely szerint a karbonil és alifás ¹³C kémiai eltolódások a peptidlánc konformációjának függvényében bizonyos aminosav egységekre több ppm-es eltérést mutatnak szilárd fázisban [11]. A mérések céljából az aminosavszekvencia elején, közepén és végén ¹³C, ¹⁵N „izotópklasztereket” építettünk be a peptidmolekulába. A peptidre vonatkozó ¹³C rezonanciajelek megkülönböztetése (kiválasztása) a velük átfedő, nagy feleslegben

jelenlevő lipidmolekuláktól származó rezonanciajelektől a $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$ hetero- illetve $^{13}\text{C}\{^{13}\text{C}\}$ homonukleáris dipoláris csatoláson alapuló REDOR [7] illetve rotációs rezonancia [8] szilárd fázisú NMR mérésekkel történt. Az $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}_6$, $[^{15}\text{N}]\text{Leu}_7$, $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}_{13}$, $[^{15}\text{N}]\text{Leu}_{14}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}_{21}$, $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}_{22}$ izotópjelzett maximin 4 Leu₆, Ala₁₃, és Leu₂₁ pozíciókban meghatározott ^{13}C kémiai eltolódás értékei a membránba ágyazott peptid (DPPC, L/P=40) *alfa-hélix* konformációjára utaltak. Vizsgálatainkat több különböző lipid összetételnél (DPPC; DPPC:DPPG 2:1; DPPC:DPPG 1:1) és lipid/peptid molaránynál (L/P=20, 40) elvégeztük, és hasonló eredményre jutottunk.

B) Vizsgálatok SDS és DPC micellákban, valamint metanolban

A szilárd fázisú NMR kísérletekkel történő összehasonlítás végett oldatfázisú NMR vizsgálatokat végeztünk negatív töltésű (SDS) és zwitterionos (DPC) micellák jelenlétében, valamint 50% metanos oldatban. A kémiai eltolódások diszperzitásának növekedése a vizes oldatban tapasztalható képest a peptid (1.5 mM) kötődésére, és jól definiált másodlagos szerkezet jelenlétére utalt mind az SDS-t (200 mM), mind a DPC-t (350 mM) tartalmazó oldatban. DPC esetében a peptid rezonanciajeleinek erős vonalszélesedése akadályozta a teljes jelhozzárendelést, így a továbbiakban az SDS-es oldatra koncentráltunk. Az elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások szétválasztása érdekében az SDS-es oldatban nyert szerkezetet később összevetettük a peptid 50%-os metanos oldatban felvett térszerkezetével. A jelhozzárendelést és a távolságkényszerek meghatározását mindkét esetben két dimenziós $^1\text{H}-^1\text{H}$ TOCSY, $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY és ^{13}C -HSQC NMR mérések [10] segítségével végeztük. A peptid mind SDS-es oldatban, mind pedig 50% metanol jelenlétében hélix-kanyar-hélix konformációt öltött. Bár a hélixek pozíciója és hossza a két különböző környezetben hasonló volt, markáns eltérések mutatkoztak a kanyart stabilizáló másodlagos kölcsönhatásokat illetően, valamint a lizin oldalláncok helyzetét, és ennek megfelelően a peptidmolekula töltéeloszlását tekintve. Ez utóbbi nagy valószínűséggel összefüggésben van a peptid bakteriális szelektivitásával, hiszen míg a prokarióta sejtek membránjának külső rétegében nagy számban vannak jelen negatív töltésű foszfolipidek [12], az eukarióta sejtek membránja elektromosan semleges [13]. A lizin oldalláncok elhelyezkedésében tapasztalható különbségek a két szerkezetben egyúttal befolyásolják a hélixek relatív hidrofób/hidrofil szögét, amely paraméter korábbi, más antimikrobiális peptideken végzett vizsgálatok alapján szintén összefügg a peptidek szelektivitásával [14].

2.2. A peptidláncok helyzetének meghatározása a lipid kettősrétegben

A peptid helyzetének vizsgálata céljából a membránban $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR kísérletek segítségével $^{13}\text{C}-^{31}\text{P}$ távolságméréseket végeztünk a peptidlánc különböző pontjain elhelyezett ^{13}C -jelzett funkciós csoportok és a lipidmolekulák foszfodiészter csoportjai között. Vizsgálataink mind elektromosan semleges (DPPC), mind pedig negatív töltésű (DPPC:DPPG, 1:1) lipid kettősrétegekben arra utaltak, hogy az izotópcímkevel ellátott Leu₆, Leu₂₁ karbonil- és Ala₁₃ metilcsoportra vonatkozóan a $^{13}\text{C}-^{31}\text{P}$ peptid-lipid távolság meghaladja a 8 Å-öt, azaz a peptidlánc mélyen a hidrofób alkiláncok közé merül a membránban. A hidrofób aminosavvegyeségeken kívül ebben valószínűsíthetően szerepe van a hosszú, amfipatikus oldallánccal rendelkező négy lizinnek (Lys₁₁, Lys₁₅, Lys₁₉, Lys₂₄), amelyek láncvégi ammóniumcsoportjuk révén mély penetráció esetén is képesek elektrosztatikus kölcsönhatást létesíteni a lipid fejcsoportokkal. A lizin aminosavaknak ezt

a „búvárpipára” emlékeztető sajátosságát korábban más membránpeptidek esetében is megfigyelték [15].

A REDOR mérésekkel összhangban a peptidnek a lipid alkil láncok közé merülését jelezték a peptid koncentráció függvényében (L/P=20, 50, 100, 200) végzett DSC mérések. Mind DPPC, mind DPPC/DPPG (1:1) membránokban a gél-folyadékkristályos fázisátmenet hőmérsékletének és szabadentalpiájának csökkenését figyeltük meg növekvő peptid koncentráció mellett. Ez tipikusan a lipidmolekulák pakolódásában bekövetkező zavarra utal, ami alapján feltételezhető, hogy a peptid kötődése a membránhoz megbontja a lipid alkil láncok közötti hidrofób kölcsönhatást. A továbbiakban ^2H NMR mérésekkel [16] tervezzük a peptidnek a membrán rendezettségére gyakorolt hatásának részletes vizsgálatát.

A peptidlánc orientációjának meghatározására a lipid kettősrétegben az aminosavszekvencia különböző pontjain ^{15}N -jelzett izotópcímkeket helyeztünk el, és üveglapokon orientált maximin 4-et tartalmazó lipid kettősrétegeken statikus szilárd fázisú NMR méréseket végeztünk. A peptid-lipid komplexen mért 1D ^{15}N és 2D PISEMA [17] és SAMMY [18] spektrumok L/P=50 lipid/peptid molaránynál a peptidlánc kitüntetett orientációját mutatták a membránban. Az eddig alkalmazott izotópjelöléssel (Ala₁₂, Ala₁₃, Leu₁₄, Ala₂₂) sikerült megállapítani, hogy a peptidlánc C-terminális fele elektromosan semleges (DMPC) és negatív töltésű lipid kettősrétegekben (DMPC/DMPG, 2:1) közel azonos, 30° illetve 38°-os szöget zár be a membrán normáljával. Szintén hasonló értékek adódtak a hélix rotációs szögére vonatkozóan: 19° (DMPC) vs. 28° (DMPC/DMPG, 1:1). Annak eldöntésére, hogy egyetlen hélixről van-e szó, vagy pedig a metanosos illetve az SDS-es oldatban található hasonló módon az aminosavszekvencia közepén a hélix V alakban megtörik, további, a peptidlánc N-terminális felének orientációját célzó mérések szükségesek. Az ezekhez szükséges ^{15}N -jelzett peptidek részben rendelkezésünkre állnak, részben új pozíciókban kívánunk izotópcímkeket elhelyezni.

2.3. A peptidláncok aggregációs sajátosságainak vizsgálata a membránban

Annak eldöntésére, hogy a maximin 4 peptidek monomerként, vagy pedig egymással asszociátumot képezve fejtik ki aktivitásukat a membránban ^{13}C - ^{15}N intermolekuláris távolságméréseket végeztünk a multilamelláris vezikulákba ágyazott specifikusan ^{13}C - illetve ^{15}N -izotópjelzett peptidláncok között. Eddig két pozíciót vizsgáltunk meg az aminosavszekvencia mentén: az Ala₁₃ és Ala₂₂-es aminosavegységeket. Vizsgálataink mindkét esetben a $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$ REDOR mérés detektálási határán kívül eső, 5 Å-nél nagyobb $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{Ala}_{13}\text{-}[^{15}\text{N}]\text{Ala}_{13}$, $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{Ala}_{22}\text{-}[^{15}\text{N}]\text{Ala}_{22}$ intermolekuláris peptid-peptid távolságot jeleztek. Ez az eredmény természetesen nem zárja ki az asszociációt a peptidláncok között, így a kérdés eldöntéséhez további vizsgálatokra van szükség. Ideálisan ^{15}N helyett előnyösebb lenne a peptidláncba ^{19}F magot beültetni (pl. egy alanin $-\text{CH}_3$ csoportját $-\text{CH}_2\text{F}$ -re cserélni), mivel a ^{19}F mag nagyobb giromágneses hányadosának köszönhetően kitolhatnánk 5 Å-ről ($r_{\text{max}} \text{ } ^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$) 12 Å-re ($r_{\text{max}} \text{ } ^{13}\text{C}\text{-}^{19}\text{F}$) a távolságmeghatározás detektálási határát. A jelenlegi műszerezettség laboratóriumunkban ezt nem teszi lehetővé, így valószínűleg együttműködés keretében fogjuk tudni a kérdést megválaszolni. Tekintve azonban magának a ^{19}F -jelzett aminosavaknak a magas költségeit, mielőtt ebben az irányban továbbindulnánk, fluoreszcenciás (FRET) előkísérleteket [19] tervezünk magának az asszociáció létezésének megállapítására/elvetésére.

2.4. A membrán összetételének hatása a pórusképződés mechanizmusára

Az AMP-k baktériumok iránt mutatkozó szelektivitásának hátterében vélhetően a prokarióta és eukarióta sejtmembrán lipidösszetételében fellelhető különbségek állnak. Kutatásunk során eddig negatív töltéssel rendelkező (prokarióta-jellegű) és elektromosan semleges (eukarióta-jellegű) membrán-mimetikus rendszerekben vizsgáltuk meg a baktériumok iránt szelektivitást mutató maximin 4 peptid különböző sajátosságait. Az elektromos töltésen kívül más különbségek is léteznek a két membrán típus között, pl. koleszterin jelenléte illetve hiánya, kettősréteget destabilizáló foszfolipidek aránya; ezekkel a későbbiekben kívánunk foglalkozni.

Szilárd fázisú NMR vizsgálatok alapján a peptid mind negatív töltésű (DPPC:DPPG, 2:1 és 1:1), mind elektromosan semleges (DPPC) lipid kettősrétegekben alfa-hélix szerkezetet öltött. Ugyanezt erősítették meg az oldatfázisú NMR vizsgálatok. Ez utóbbiak során fény derült arra is, hogy a hélix a szekvencia közepén megtörik és V alakra emlékeztető konformációt vesz fel. Bár a hélixek pozíciója és hossza SDS-micellákban és metanolos oldatban hasonló volt, eltéréseket tapasztaltunk a) a két hélix közötti kanyart stabilizáló kölcsönhatásokban és b) a molekulafelszín töltéeloszlásában. Ez utóbbi tényező meghatározó módon képes befolyásolni a peptidnek a foszfolipid fejcsoportokkal való kölcsönhatását, valamint a hidrofób alkil láncok közé ékelődését, és ezáltal a membránban keletkező diszturbanciát.

A peptid és a lipid fejcsoportok közötti távolságmeghatározásra irányuló, valamint a peptid C-terminális felének lipid kettősrétegben való orientációját célzó szilárd fázisú NMR vizsgálatok a molekula mély penetrációját jelezték a lipid alkil láncok közé mind negatív töltésű, mind zwitterionos membránban. Negatív töltésű membránokban, a lizin oldalláncoknak a lipid fejcsoportokkal való erős elektrosztatikus kölcsönhatása következtében a peptid vélhetően a fejcsoportokat is magával húzza, ami a kettősréteg elvékonyodásához és görbületi sajátosságainak megváltozásához vezet. Eukarióta membránokban, ahol a hidrofób kölcsönhatások dominálnak, ez az effektus kevésbé markánsan jelentkezik, és feltételezhető, hogy ebből adódik a kisebb aktivitás. A konkrét pórusmodell felállításához további vizsgálatok szükségesek a peptidláncok N-terminális felének orientációját, valamint a peptidláncok közötti lehetséges aggregációt illetően.

3. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A témában eddig 1, az OTKA támogatását feltüntető könyvfejezetet (Encyclopedia of Magnetic Resonance, 2010) publikáltunk. Két eredeti közlemény szerkesztés alatt áll, melyek a *European Biophysics Journal* membránpeptideknek dedikált különszámában fognak megjelenni várhatóan a jövő év elején.

Eredményeink egy részét a „Biophysics of Membrane-Active Peptides” címmel megrendezett 455. WE-Heraeus miniszimpóziumon (Bad Honnef, Germany) poszter és előadás keretében mutattuk be 2010 áprilisában. (*Toke et al., Structure of maximin 4, an antimicrobial peptide from *Bombina maxima* in membrane-mimicking environments as determined by solution and solid-state NMR*)

2010 júliusában újabb posztert mutattunk be az EUROMAR nemzetközi NMR konferencián. (*Toke et al., Solution and solid-state NMR investigation of maximin 4, an antimicrobial frog-peptide in membrane-mimicking environments*)

4. EGYÉB, ÁLTALÁNOS EREDMÉNYEK, ELISMERÉSEK

OTKA – Élet és Tudomány Ismeretterjesztő Cikkpályázat, 2007, I. díj
Tőke Orsolya: Antibiotikum-jelöltek vizsgálata NMR spektroszkópiával – Bepillantás a pórusképződés mechanizmusába

5. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Van't Hof W, Veerman ECI, Helmerhorst EJ, Amerongenm AVN (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382:597-619
- [2] Hancock REW, Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology* 8:402-410
- [3] Epand RM, Vogel HJ (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462:11-28
- [4] Toke O (2005) Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80:717-735
- [5] Lai R, Zheng YT, Shen JH, Liu GJ, Liu H, Lee WH, Tang SZ, Zhang Y (2002) Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides* 23:427-435
- [6] M. Mehring, *Principles of High Resolution NMR in Solids*, 2nd edn., Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- [7] T. Gullion and J. Schaefer, *Rotational echo double-resonance NMR*, *J. Magn. Res.* 81 (1989) 196-200.
- [8] D. P. Raleigh, M. H. Levitt, M. H., R. G. Griffin, *Rotational resonance in solid state NMR*, *Chem. Phys. Lett.* 146 (1988) 71-76.
- [9] S. J. Opella and F. M. Marassi, *Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy*, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3587-3606.
- [10] Wüthrich K *NMR of proteins and nucleic acids*, Wiley, New York, 1986.
- [11] Saito H (1986) Conformation-dependent ¹³C chemical shifts: a new means of conformational characterization as obtained by high-resolution solid-state ¹³C NMR. *Magn Res Chem* 24:835-852
- [12] Verkleij, A. J.; Zwaal, F. A.; Roelofsen, B.; Comfurius, P.; Kastelijn, D.; van Deenen, L. L. *Biochim Biophys Acta* 1973, 323, 178-193.
- [13] Ratledge, C.; Wilkinson, S. G. Eds. (1998) Academic, London, UK *Microbial Lipids*, Vol 1
- [14] Wieprecht T, Dathe M, Epand RM, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M (1997) Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 36:12869-12880
- [15] Segrest JP, de Loof H, Dohlman JG, Brouillem CG, Anantharamaiah GM (1990) Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* 8:103-117
- [16] Petrache HI, Dood SW, Brown MF (2000) Area per lipid and acyl chain length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by 2H NMR spectroscopy. *Biophys J* 79:3172-3192
- [17] Wu CH, Ramamoorthy A, Opella SJ (1994) High-resolution heteronuclear dipolar solid-state NMR spectroscopy. *J Magn Reson A* 109:270-272
- [18] Nevzorov AA, Opella SJ (2003) A „Magic Sandwich” pulse sequence with reduced offset dependence for high resolution separated local field spectroscopy. *J Magn Reson* 164:182-186.
- [19] Turner, J. D.; Rouser, G. *Anal Biochem* 1970, 38, 437-445.