

KONFORMAČNÍ STUDIE ANTI-MIKROBIÁLNÍHO PEPTIDU MELEKTINU METODAMI CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU

STANISLAV KYKAL^{a*}, VÁCLAV ČEŘOVSKÝ^b
a VLADIMÍR SETNÍČKA^a

^a Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
stanislav.kykal@vscht.cz

Došlo 13.12.12, přijato 22.1.13.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, konformace, cirkulární dichroismus

Úvod

Peptidy jsou součástí téměř všech forem života. V imunitním systému živých organismů tvoří jednu z hlavních složek obrany proti infekcím. V tomto případě se jedná o tzv. antimikrobiální peptidy¹. Mechanismus jejich působení na bakterie je odlišný od současně používaných konvenčních antibiotik, v důsledku čehož bakterie dosud nevykazují, na rozdíl od konvenčních antibiotik, významnou rezistenci vůči těmto peptidům. Proto by antimikrobiální peptidy mohly v budoucnu podpořit léčbu konvenčními antibiotiky nebo je i v některých případech nahradit a hrát tak důležitou roli ve farmaceutickém průmyslu. Také z toho důvodu jsou antimikrobiální peptidy předmětem mnoha studií^{2,3}. V současné době je největší pozornost zaměřena na peptidy izolované z hmyzu, neboť právě hmyz se dokázal přizpůsobit téměř jakémukoliv prostředí, a to vlastní syntézou antimikrobiálních peptidů, díky kterým se stal rezistentní proti mnoha typům infekcí⁴. Antimikrobiální aktivita těchto peptidů je ovlivněna mnoha parametry⁵, jedním z nejdůležitějších je jejich konformace.

Cílem této práce bylo studovat konformaci jednoho z potenciálně zajímavých antimikrobiálních peptidů, zvaného melektin (MEP), a jeho syntetických analogů. MEP byl izolován z jedu kleptoparazitické včely *Melecta albifrons*³. Patří do skupiny kationických amfipatických α -helikálních peptidů. Skládá se z 18 aminokyselin, jejichž

sekvence je H-Gly-Phe-Leu-Ser-Ile-Leu-Lys-Lys-Val-Leu-Pro-Lys-Val-Met-Ala-His-Met-Lys-NH₂. V centrální části peptidového řetězce se nachází aminokyselina prolin, která dělá MEP strukturně zajímavým – značně ovlivňuje jeho antimikrobiální aktivitu³.

Spektroskopické studie peptidů se provádí nejen ve vodném prostředí, ale často se používají vodné směsi s jinými rozpouštědly, např. trifluorethanolem (TFE), propanolem a dalšími⁶. Roztoky obsahující TFE mají schopnost indukovat tvorbu α -helikálních struktur tak, jak se tomu děje v prostředí biologické membrány. Proto jsou ve studii konformace MEP a jeho analogů jako rozpouštědla použita právě voda a TFE^{7,8}. V následujícím textu je kladen důraz na diskusi výsledků získaných při konformační studii ve vodných roztocích.

Velmi vhodnými metodami pro konformační studie peptidů jsou spektroskopie elektronového (ECD) a vibračního cirkulárního dichroismu (VCD)⁶. Tyto chiroptické metody vykazují oproti běžně používané absorpční spektroskopii, ať v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) nebo infračervené (IČ) spektrální oblasti, velkou citlivost k sekundární struktuře peptidů, kterou lze pomocí ECD a VCD dobře identifikovat na základě analýzy charakteristických spektrálních pásů v oblastech, kde se projevují elektronové přechody amidové skupiny peptidové vazby v případě ECD, nebo v tzv. oblasti amidu I (C=O valenční vibrace peptidové vazby) v případě VCD^{6,9,10}. Ze spektru ECD lze dokonce s poměrně velkou spolehlivostí určit procentuální zastoupení jednotlivých konformací v peptidu, například metodami využívajícími neuronové sítě¹¹.

Experimentální část

Pro měření spektru IČ a VCD roztoků peptidů byla jako rozpouštědlo použita deuterovaná voda (D₂O, Isosar, 99,9% D), v případě ECD redestilovaná voda. Izolace jedu získaného ze včely *Melecta albifrons*, jeho přečištění pomocí RP-HPLC, určení sekvence aminokyselin v peptidovém řetězci melektinu metodou MALDI-TOF MS a pomocí Edmanova odbourávání bylo provedeno a publikováno³ skupinou Václava Čeřovského. Poté byla touto skupinou provedena totální syntéza melektinu a jeho analogů (tab. I). Zkratky označující jednotlivé peptidy byly převzaty z práce³. Po syntéze byly dále surové peptidy přečištěny metodou RP-HPLC a byla provedena trojnásobná lyofilizace v prostředí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol l⁻¹ vedoucí k odstranění kyseliny trifluoroctové, jejíž absorpční pásy interferují s pásy peptidu v oblasti amidu I IČ spektra. Roztoky peptidů o koncentraci 50 g l⁻¹ byly měřeny metodami ECD a VCD.

* Stanislav Kykal tuto práci úspěšně prezentoval na soutěži o cenu firmy Merck 2012 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

Tabulka I

Aminokyselinové sekvence melektinu a jeho studovaných analogů

Zkratka ^a	Sekvence peptidů
MEP	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂
MEP-1	GFLSILKKVLKKVMAHMK-NH ₂
MEP-3	GFLSILKKVLAKVMAHMK-NH ₂
MEP-4	GFLSILKKVLGKVMAMHK-NH ₂
MEP-5	KVMAHMK-NH ₂
MEP-6	PKVMAHMK-NH ₂
MEP-9	GFLSILKKVLP-NH ₂
MEP-10	GFLSILKKVL-NH ₂

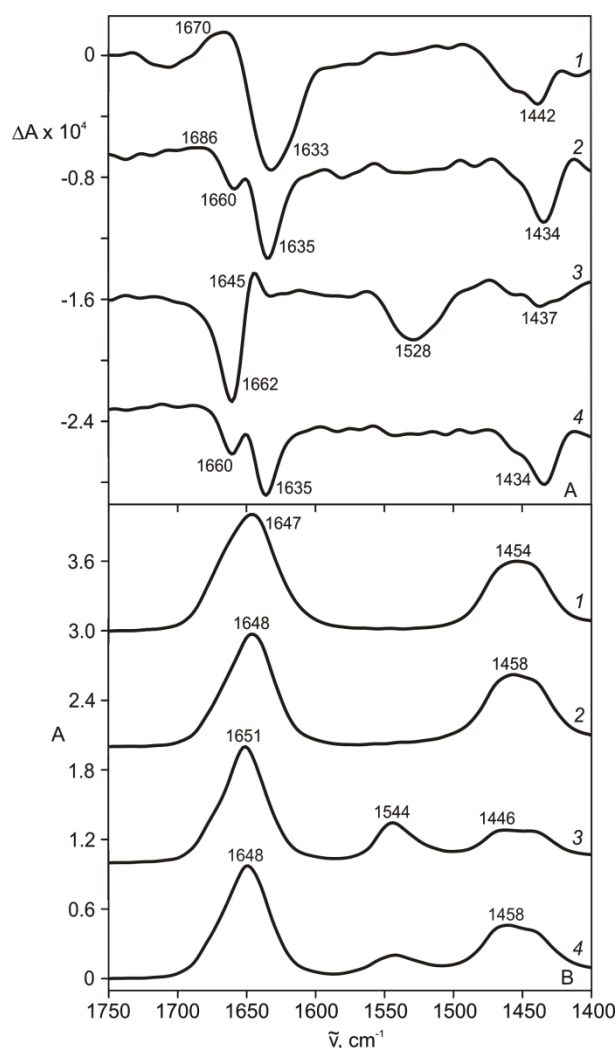
^a Zkratky označující jednotlivé peptidy byly převzaty z cit.³

Měření IČ a VCD ve spektrální oblasti 1750–1400 cm⁻¹ bylo provedeno na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S vybaveného VCD/IRRAS modulem PMA 37 (oboje Bruker, Německo)¹². Pro měření vzorků peptidů byla použita rozebíratelná kyveta typu A145 (Bruker, Německo) s okénky z CaF₂ a teflonovou distanční fólií tloušťky 23 μm. Spektra byla měřena s rozlišením 8 cm⁻¹. Měření spekter VCD probíhalo v blocích. Jeden blok byl získán akumulací 3680 dílčích záznamů (doba měření 20 min) a pro každý peptid byla provedena opakovaná měření typicky 6–10 bloků. Tyto bloky byly poté zprůměrovány a získáno tak spektrum VCD, od kterého bylo následně odečteno spektrum VCD rozpouštědla změřeného za identických podmínek. Tím byla provedena korekce základní linie a získáno výsledné spektrum VCD peptidu. Následně byla u všech spekter (IČ i VCD) provedena normalizace na jednotkovou hodnotu absorpce maxima pásu amidu I' (je-li měřeno v deuterovaných rozpouštědlech) v IČ spektru a takto získaná spektra jsou prezentována dále v textu.

Měření spekter ECD v oblasti 190–260 nm bylo provedeno na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko). Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě (Suprasil, Hellma) s optickou dráhou 10 μm. Rychlost skenování byla 50 nm min⁻¹ a počet akumulací 4. Spektra ECD peptidů byla poté korigována na základní linii odečtením spektra redistilované vody použité pro přípravu roztoků peptidů. Odhad procentuálního zastoupení konformací v jednotlivých peptidech byl proveden na základě analýzy spekter ECD v programu CDNN 2.1 (Delphi).

Výsledky a diskuse

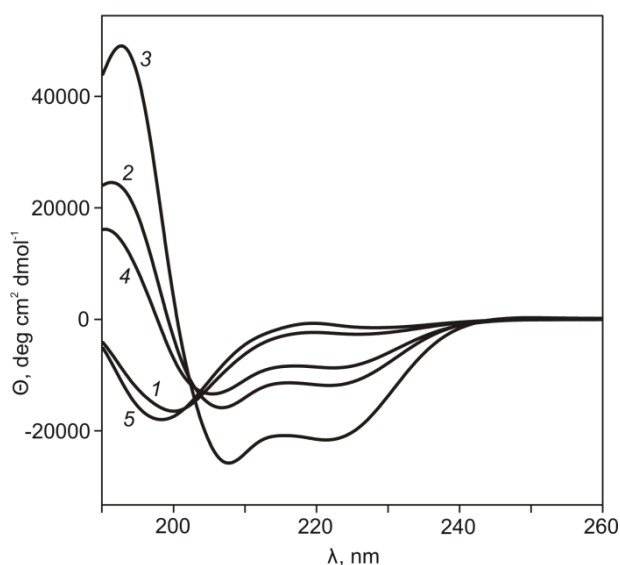
Nejprve byla měřena spektra IČ a VCD melektinu (MEP) v D₂O. Výsledná spektra jsou na obr. 1. Maximum pásu amidu I' v IČ spektru se nachází u vlnočtu ~1647 cm⁻¹,



Obr. 1. Spektra VCD (A) a IČ absorpční spektra (B) peptidů MEP (1), MEP-1 (2), MEP-3 (3) a MEP-4 (4) měřená v D₂O. Spektra jsou normalizována na jednotkovou hodnotu absorpce maxima pásu amidu I' a vzájemně posunuta

přičemž tato poloha naznačuje, že peptid MEP zaujal konformaci označovanou jako poly-prolin II (PPII)^{9,13}. Ve spektru VCD se v oblasti amidu I' vyskytuje negativní couplet tvořený záporným intenzivnějším pásem ~1633 cm⁻¹ a kladným pásem ~1670 cm⁻¹. Tento couplet je charakteristickým znakem konformace PPII^{9,13}, což potvrzuje předpoklad vyplývající z IČ spektra. Aminokyselina prolin vázaná v centrální části peptidového řetězce podporuje vznik této konformace, neboť u peptidů bohatých na prolin většinou nedochází ke vzniku konformace stabilizované intramolekulárními vodíkovými můstky.

Konformace peptidu MEP byla také sledována metodou ECD. Spektrum je zobrazeno na obr. 2. V tomto spektru získaném po rozpuštění peptidu v redistilované vodě byl pozorován především záporný pás u 200 nm. V oblasti



Obr. 2. Spektra ECD peptidů MEP (1), MEP-1 (2), MEP-3 (3), MEP-4 (4) a MEP-9 (5) měřená v redestilované vodě

kolem 222 nm, která charakterizuje případnou přítomnost α -helikální konformace, se pás o významné intenzitě nevyskytuje. Průběh spektra tedy odpovídá konformaci PPII, což je plně v souladu s výsledky získanými z VCD. Spektrum ECD bylo dále využito k analýze metodou neuronových sítí (program CDNN), což vedlo k určení přibližného procentuálního zastoupení jednotlivých konformací v peptidu MEP. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v tab. II. Peptid MEP za daných podmínek obsahuje 45 % konformace PPII a pouhých 6 % α -helixu. Tyto výsledky potvrzují jednoznačnou převahu konformace PPII, kterou peptid MEP zaujal, vyplývající také z již uvedené interpretace spekter VCD a ECD.

Další studované peptidy, v nichž je prolin v centrální části řetězce nahrazen jinou aminokyselinou, jsou MEP-1, MEP-3 a MEP-4. U peptidu MEP-1 je místo prolinu v peptidovém řetězci navázán lysin, u MEP-3 je prolin nahrazen alaninem a v případě MEP-4 je místo prolinu umístěn glycin. Výsledná spektra IČ a VCD těchto peptidů jsou znázorněna na obr. 1. Peptidy MEP-1 a MEP-4 poskytují velmi podobná spektra IČ i VCD. V IČ spektrech se pás amidu I' vyskytuje u vlnočtu $\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ pro oba tyto peptidy, zatímco pro MEP-3 se nachází u vlnočtu $\sim 1651\text{ cm}^{-1}$. Tento posun k vyšším vlnočtům ve srovnání s peptidem MEP, jehož pás amidu I' byl pozorován při vlnočtu $\sim 1647\text{ cm}^{-1}$, naznačuje přítomnost α -helikální konformace. Ve spektrech VCD těchto peptidů bylo však možné sledovat mnohem výraznější změny. U peptidů MEP-1 a MEP-4 spektra VCD vykazují v oblasti amidu I' intenzivní záporný pás $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ a slabý kladný pás v oblasti kolem $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$, přičemž mezi těmito dvěma pásy typickými pro konformaci PPII se nachází záporný pás $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ charakterizující přítomnost α -helikální

Tabulka II

Zastoupení konformací α -helix a PPII v jednotlivých peptidech na základě analýzy spekter ECD

Peptid	α -helix [%]	PPII [%]
MEP	6	45
MEP-1	37	32
MEP-3	71	11
MEP-4	25	30
MEP-9	5	48

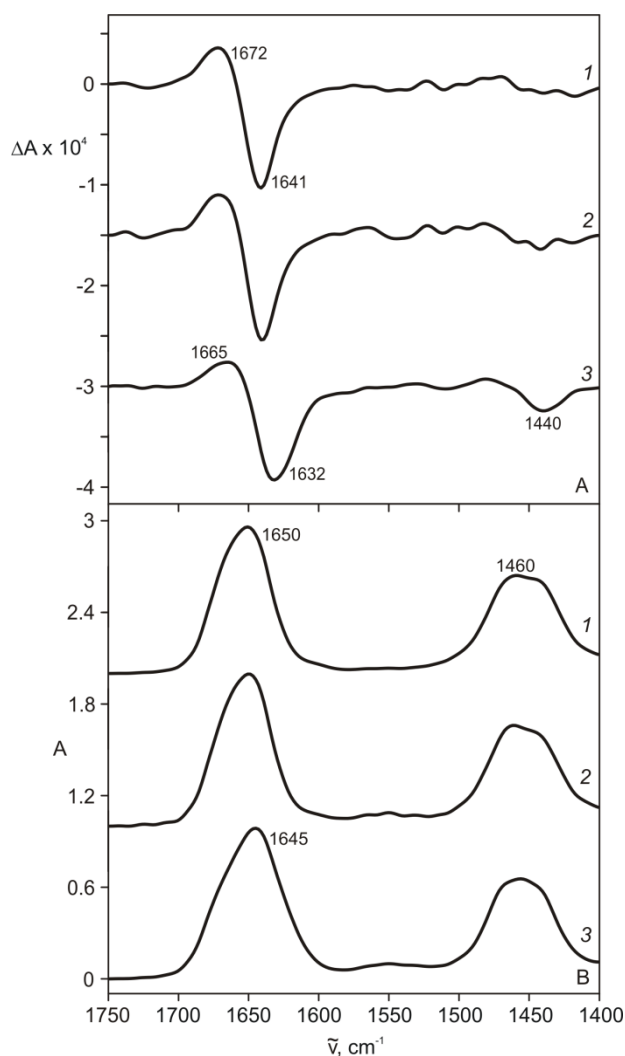
konformace^{14,15}. Tyto průběhy spekter indikují současnou přítomnost konformací PPII a α -helix, což platí pro peptidy MEP-1 i MEP-4. Na základě spekter VCD, kde záporný pás pro konformaci PPII je mnohem intenzivnější než záporný pás charakterizující α -helix, se lze také domnívat, že konformace PPII v těchto peptidech převažuje. Je známo^{16–18}, že aminokyseliny lysin i glycin vázané uvnitř peptidového řetězce podporují vznik konformace PPII, přičemž toto tvrzení odpovídá získaným výsledkům. Zcela jiné chování vykazuje peptid MEP-3. Oblast amidu I' ve spektru VCD tohoto peptidu je tvořena pozitivním coupletem, který se skládá z kladného pásu $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ a intenzivního záporného pásu $\sim 1662\text{ cm}^{-1}$. Průběh tohoto coupletu velmi dobře odpovídá charakteristikám α -helikální konformace^{14,15}, přičemž přítomnost této konformace v případě peptidu MEP-3 je v dobré shodě s jeho IČ spektrem. Aminokyselina alanin v peptidovém řetězci všeobecně podporuje vznik α -helikální konformace^{19,20}. V sekvenci peptidu MEP-3 se nachází dva alaniny, což může být hlavním důvodem pro vznik této konformace.

Studie ECD poskytla další zajímavé informace o peptidech MEP-1, MEP-3 a MEP-4. Jejich spektra jsou prezentována na obr. 2. Spektra ECD peptidů MEP-1 a MEP-4 se opět velmi podobají. V obou spektrech se nachází pozitivní pás 191 nm a dva negativní pásy 206 a 222 nm. Tento průběh spekter v hrubých rysech odráží přítomnost α -helikální konformace. Spektrální pásy však nejsou příliš intenzivní, což naznačuje příměs konformace PPII. V případě MEP-3 byl ve spektrech ECD pozorován kladný pás 193 nm a dva negativní pásy 208 a 222 nm. Polohy i intenzity těchto pásů odpovídají charakteristikám α -helikální konformace. Výsledky studie ECD tedy plně podporují předchozí interpretace spekter IČ a VCD. Dále byla provedena analýza spekter ECD peptidů MEP-1, MEP-3 a MEP-4 s využitím neuronových sítí. Výsledky jsou uvedeny v tab. II. V peptidu MEP-1 se za daných podmínek vyskytuje 37 % α -helikální konformace a 32 % konformace PPII. V případě peptidu MEP-4 je to 25 % konformace α -helix a 30 % konformace PPII. Oba tyto peptidy tedy zaujaly konformaci o přibližně stejném zastoupení konformací α -helix a PPII v každém z nich. Peptid MEP-3 vykazuje 71 % α -helixu a pouze 11 % konformace PPII – α -helikální konformace tedy jednoznačně převládá. Tento výsledek je plně v souladu s průběhem spekter VCD.

Pro další studii vlivu prolinu vázaného v centrální části peptidového řetězce na konformaci peptidů byla měřena spektra IČ a VCD *C*-koncových a *N*-koncových fragmentů melektinu. Mezi *C*-koncové fragmenty patří peptidy MEP-5 a MEP-6, v případě *N*-koncových fragmentů se jedná o peptidy MEP-9 a MEP-10. Peptid MEP-10, *N*-koncový fragment bez prolinu, se choval zcela odlišně než ostatní fragmenty. Jeho rozpuštění v D₂O trvalo velmi dlouhou dobu a muselo být podpořeno stálým mícháním na vibrační třepačce. Po úplném rozpuštění byl však při požadované koncentraci peptidu získán velmi hustý gel. Při měření VCD pak nebyly získány spolehlivě interpretovatelné výsledky. Spektra VCD se měnila s orientací kyvety a vzorek poskytoval o dva řády větší signál, než je obvyklé, což naznačovalo vznik makroskopicky orientovaných struktur (spektra nejsou prezentována). Také v ECD

byl získán netypický průběh spektra, který nenaznačoval přítomnost žádné ze základních sekundárních struktur. Metodami CD tedy nebylo možno konformaci ani strukturu v tomto případě spolehlivě určit.

Spektra VCD fragmentů MEP-5, MEP-6 a MEP-9 zobrazená na obr. 3 se vzájemně velmi podobají. Zatímco *C*-koncové fragmenty MEP-5 a MEP-6 poskytly v oblasti amidu I' spektra VCD negativní couplet tvořený záporným pásem ~1641 cm⁻¹ a kladným pásem ~1672 cm⁻¹, peptid MEP-9, *N*-koncový fragment s prolinem, poskytl negativní couplet s pásy ~1632 a ~1665 cm⁻¹. Negativní couplety u těchto tří peptidů jsou charakteristickými rysy konformace PPII. Jelikož oba *C*-koncové fragmenty MEP-5 a MEP-6 dle spektrálního průběhu zaujaly konformaci PPII, lze tvrdit, že konformace *C*-koncového fragmentu není závislá na přítomnosti prolinu v peptidovém řetězci. Naproti tomu u *N*-koncových fragmentů peptid MEP-9 vykazoval konformaci PPII, zatímco peptid MEP-10 vytvořil pravděpodobně makroskopicky orientovanou strukturu projevující se gelováním vzorku. Z tohoto lze usoudit, že přítomnost aminokyseliny prolinu navázané na *N*-koncovém fragmentu hraje důležitou roli, protože významně ovlivňuje jeho konformaci. Na základě výsledků z VCD nebyla konformace *C*-koncových fragmentů dále studována pomocí ECD, neboť bylo dostatečně prokázáno, že se konformace PPII těchto peptidů příliš nemění. Naproti tomu bylo naměřeno spektrum ECD peptidu MEP-9, které je prezentováno na obr. 2. Ve spektru je pozorován záporný pás 198 nm, přičemž tento pás a průběh spektra odráží přítomnost konformace PPII. Při využití metody neuronových sítí k analýze tohoto spektra byl zjištěn obsah konformace PPII 48 % a 5 % α -helixu, jak je uvedeno v tab. II. Tato analýza dokazuje převahu konformace PPII v peptidu MEP-9, což je v souladu s výsledky z VCD.



Obr. 3. Spektra VCD (A) a IČ absorpční spektra (B) peptidů MEP-5 (1), MEP-6 (2) a MEP-9 (3) měřená v D₂O. Spektra jsou normalizována na jednotkovou hodnotu absorbance maxima pásu amidu I' a vzájemně posunuta

Závěr

Pomocí spektroskopii VCD a ECD byly sledovány konformační změny peptidu MEP a jeho analogů ve vodných roztocích. Získané výsledky jsou shrnuty v následujících odstavcích.

Při měření VCD peptidů MEP, MEP-1, MEP-3 a MEP-4 v D₂O, které se od sebe vzájemně liší pouze jednou aminokyselinou v centrální části peptidového řetězce, byly zjištěny značné rozdíly v jejich konformaci. Peptid MEP obsahující prolin zaujal konformaci typu PPII bez významného podílu konformace α -helix. U peptidu MEP-3 s alaninem tomu bylo naopak, tento peptid jednoznačně vykazoval vysoký obsah α -helikální konformace. V případě peptidů MEP-1 s lysinem a MEP-4 s glycinem byla pozorována současná přítomnost konformací α -helix i PPII, přičemž žádná z těchto konformací nebyla dominantní. Tyto rozdíly v konformaci peptidů byly také sledovány prostřednictvím ECD těchto peptidů v redestilované vodě. Výsledná spektra ECD byla použita pro výpočet procentuálního zastoupení konformací v těchto peptidech pomocí neuronových sítí. Peptidy MEP-5, MEP-6

a MEP-9 zaujaly v D₂O konformaci PPII. Pro peptid MEP-10 nebylo možné konformaci určit, neboť vzorek v D₂O vytvořil makroskopicky orientovanou strukturu. Naproti tomu peptid MEP-9 vykazoval konformaci PPII, a tudíž se ukázalo, že přítomnost prolinu v *N*-koncovém fragmentu hraje významnou roli. U *C*-koncových fragmentů MEP-5 a MEP-6 nebyl vliv přítomnosti prolinu pozorován.

Bylo potvrzeno, že spektroskopie CD je velmi citlivá na sekundární strukturu peptidů a je schopna podat podrobné informace i o konformaci antimikrobiálních peptidů. Proto bylo také možno zjistit přibližná procentuální zastoupení konformací α -helix a PPII v jednotlivých peptidech na základě statistického vyhodnocení spekter ECD.

Největší potenciál tvořit α -helikální konformaci, která je podstatným faktorem ovlivňujícím antimikrobiální aktivitu, vykazoval peptid MEP-3. Z výsledků bylo také zjištěno, že právě *N*-koncový fragment má významný vliv na celkovou konformaci peptidu ve vodném roztoku.

Tato studie byla realizována za podpory grantu P208/11/0105 (Grantová agentura České republiky). Autoři velmi děkují Ing. Michalu Tatarkovičovi (VŠCHT, Praha) za pomoc při vyhodnocování zastoupení sekundárních struktur.

LITERATURA

- Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).
- Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
- Čeřovský V., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Bednářová L., Borovičková L., Slaninová J., Fučík V.: *ChemBioChem* 9, 2815 (2008).
- Otvos L.: *J. Pept. Sci.* 6, 497 (2000).
- Bulet P., Stocklin R., Menin L.: *Immunol. Rev.* 198, 169 (2004).
- Keiderling T. A., v knize: *Circular Dichroism. Principles and Applications* (Berova N., Nakanishi K., Woody R. W., ed.), str. 621. Wiley-VCH, New York 2000.
- Lehrman S. R., Tuls J. L., Lund M.: *Biochemistry* 29, 5590 (1990).
- Sonnichsen F. D., Van Eyk J. E., Hodges R. S., Sykes B. D.: *Biochemistry* 31, 8790 (1992).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
- Urbanová M.: *Chirality* 21, E215 (2009).
- Böhm G., Muhr R., Jaenicke R.: *Protein Eng.* 5, 191 (1992).
- Urbanová M., Setnička V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biospectroscopy* 2, 83 (1996).
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5576 (1986).
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986).
- Setnička V., Hlaváček J., Urbanová M.: *J. Pept. Sci.* 15, 533 (2009).
- Kelly M. A., Chellgren B. W., Rucker A. L., Troutman J. M., Fried M. G., Miller A. F., Creamer T. P.: *Biochemistry* 40, 14376 (2001).
- Conlon J. M., Abdel-Wahab Y. H. A., Flatt P. R., Leprince J., Vaudry H., Jouenne T., Condamine E.: *Peptides* 30, 888 (2009).
- Yoder G., Pančoška P., Keiderling T. A.: *Biochemistry* 36, 15123 (1997).
- Martinez G., Millhauser G.: *J. Struct. Biol.* 114, 23 (1995).

S. Kykal^a, V. Čeřovský^b, and V. Setnička^a (^a Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Conformational Study of the Antimicrobial Peptide Melectin by Circular Dichroism Methods**

Antimicrobial peptides are considered as promising supplements to or substitutes for conventional antibiotics due to their different mechanisms of action. Biological activities of antimicrobial peptides are influenced by their conformations. The solution conformations of 18 amino acid residues peptide melectin (MEP) and its synthetic analogues including *C*-terminal and *N*-terminal fragments were studied using electronic and vibrational circular dichroism spectroscopies.