

MARCIA PEREZ DOS SANTOS CABRERA

**ESTUDO DA CONFORMAÇÃO E ATIVIDADE LÍTICA DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DE VESPAS**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2006

MARCIA PEREZ DOS SANTOS CABRERA

**ESTUDO DA CONFORMAÇÃO E ATIVIDADE LÍTICA DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DE VESPAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular do Departamento de Física do Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2006

Dos Santos Cabrera, Marcia Perez.

Estudos da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas / Marcia Perez Dos Santos Cabrera. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2006.

127 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Ruggiero Neto

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica . 2. Peptídios de vespa. 3. Peptídios antimicrobianos. 4. Mastoparano. 5. Lipossomos. 6. Atividade lítica. I. Ruggiero Neto, João. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Mar Português

Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal !
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram !
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar !

Valeu a pena ? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

À memória dos meus avós, João, Ana, José e Encarnacion,
que vieram do outro lado do mundo, que não mediram esforços
e construíram nosso maior bem, a família.
À minha família dedico este trabalho e toda minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pelos ensinamentos, pela orientação segura, pela dedicação e disponibilidades constantes, mas principalmente pela acolhida e pelo reconhecimento. Que nosso trabalho em conjunto ainda nos traga mais satisfações. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. José Rogerto Ruggiero, pelos ensinamentos, pelo convívio amistoso e pela colaboração.

Ao coordenador da pós-graduação, Prof. Dr. Jorge Chahine, pelo apoio e dedicação à solução das dificuldades em relação às bolsas CAPES e CNPq.

Aos professores do Departamento de Física, e ao Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri, meu primeiro orientador, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química e Ciências Ambientais, em especial à Profa. Dra. Ieda Pastre Fertoni, pela disponibilização de seus laboratórios e equipamentos.

Aos colaboradores Dr. Katsuhiko Konno do Instituto Butantan, CAT-CEPID, Dr. Mário Sérgio Palma e Bibiana Monson de Souza, do IB, UNESP, Rio Claro pelas amostras de peptídeos.

À Profa. Iolanda Midea Cuccovia, do Instituto de Química da USP, pela atenção e colaboração, por toda ajuda e pelos ensinamentos importantes, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais Antonio e Nena, os maiores exemplos de grandeza de alma em minha vida, por toda dedicação a mim e ao meu filho. Agradeço a vocês por toda ajuda, pelo apoio incondicional e pela participação ativa em todos os momentos e, à Deus, pela sua existência.

Ao meu marido Martins, por toda dedicação a mim e ao nosso filho, pelo amor e respeito, pela cumplicidade, pela amizade, por ter me conduzido à pós-graduação, por ter tornado possível mais esta realização.

Ao meu filho Tomaz, o maior presente que Deus me deu, pelo seu amor, seu carinho, sua alegria, seu companheirismo.

Aos meus irmãos, Silvia e Toninho, pela harmonia e união que vivemos.

A todos os meus familiares e amigos, especialmente à tia Teresa e tio Zeca e à amiga Deise que foram, em muitos momentos, um apoio imprescindível.

À Mariliza, que esteve presente a cada dia durante mais de quatro anos, com seu trabalho, me ajudando a cuidar da casa e da família.

À amiga Sabrina Thaís Broggio Costa, pelo carinho, por suas atitudes exemplares, por toda preocupação, ajuda, incentivo; pela alegria e descontração de inúmeros momentos, e pelas orações: elas foram ouvidas.

Aos colegas do Departamento de Física, em especial aos amigos Sidney, Priscilla, Norma, Marisa, Leandro e Marcio, pela amizade, respeito, ajuda e pelos bons momentos. Agradeço muito a vocês e à Fernanda Costa e Aline do GOU pelas aulas para o Tomaz: quem faz pelo meu filho, faz duplamente por mim.

À secretária da pós-graduação, Rosemar, e aos funcionários do Departamento de Física, Ilva, Rose, Paulinho, Barbosa e Marcelino pela eficiência, disposição e ajuda em todos os momentos.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Oração.

Santa Tereza de Ávila, rogai por nós !

São Tomaz de Aquino, rogai por nós !

Santo Agostinho, rogai por nós !

Santos Doutores da Igreja, que fostes especialmente iluminados com a Luz do Amor e da Sabedoria do Espírito Santo, intercedei junto ao Bom Deus para que nós também recebamos um pouco da mesma Luz.

Que a Luz da Sabedoria e do Amor do Espírito Santo iluminem, permeiem nosso trabalho e nossas relações familiares para maior Glória do Pai, Amém.

SUMÁRIO

ABREVIACÕES	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Atividade biológica	4
2.1.1 Mastoparanos	7
2.2 Seletividade dos peptídeos antimicrobianos	8
2.2.1 Influência da composição, arquitetura e energia da membrana	9
2.2.2 Influência dos lipopolissacarídeos (LPS) e da membrana externa das bactérias	10
2.3 Modulação da atividade na membrana e correlação com a atividade biológica	11
2.3.1 A conformação helicoidal	11
2.3.2 Aspectos estruturais	12
2.4 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos	20
2.5 Potencial de uso terapêutico	24
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS e MÉTODOS	27
4.1 Materiais	27
4.2 Métodos	27
4.2.1 Preparação de vesículas	27
4.2.1.1 Preparação de vesículas unilamelares, pequenas (SUVs)	28
4.2.1.2 Preparação de vesículas unilamelares, grandes (LUVs)	28
4.2.1.3 Análise da concentração de fosfolipídeos em vesículas	29
4.2.2 Medidas por dicroísmo circular (CD)	29
4.2.3 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria	31
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
5.1 EMP-AF	34

5.2	Eumenitin	41
5.3	EMP-EM1, -EM2, -EM3, EM4.....	45
5.4	Polybia MP1	53
5.5	Anoplin	59
5.6	Decoralin	65
5.7	Comentários Gerais	73
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS e CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS	82
8.	APÊNDICE – Publicações	89
8.1	dos Santos Cabrera, M. P., de Souza, B. M., Fontana, R., Konno, K., Palma, M. S., de Azevedo Jr., W. F., Ruggiero Neto, J. (2004) Conformation and lytic activity of Eumenine Mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. <i>J. Peptide Res.</i> 64, 95-103.	
8.2	Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Fontana, R., Rangel, M., Oliveira, J. S., dos Santos Cabrera, M. P., Ruggiero Neto, J., Hide, I., Nakata, Y., Yasuhara, T., Nakajima, T. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp <i>Eumenes rubronotatus</i> . Available online DOI link: http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.013	
8.3	dos Santos Cabrera, M. P., Broggio, S. T., Sforça, M. L., Konno, K., Palma, M. S., Fadel, V., de Azevedo Jr., W. F., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Ruggiero, J. R., Ruggiero Neto, J. (2006) Structure and lytic activity of Anoplin, a short chain antimicrobial peptide from solitary wasp venom (em preparação).	

ABREVIÇÕES

λ	comprimento de onda	MP-X	Mastoparano X
μ	momento hidrofóbico	PA	ácido fosfatídico
τ	constante de tempo (tau)	PAM	peptídeo antimicrobiano
ANP	Anoplin	PC	fosfatidilcolina
ANP-OH	Anoplin carboxilado	PCCL 7030	vesícula composta por 70% PC e 30% CL, mol/mol
CC	concentração crítica	PCCL 4060	vesícula composta por 40% PC e 60% PG, mol/mol
CD	dicroísmo circular	PCPG 7030	vesícula composta por 70% PC e 30% PG, mol/mol
c_f	concentração de peptídeo não associado	PCPG 4060	vesícula composta por 40% PC e 60% PG, mol/mol
CL	cardiolipina	[Pep]	concentração molar de peptídeo
cmc	concentração micelar crítica	PG	fosfatidilglicerol
CTACl	cloroeto de alquiltrimetilamônio	P/L ou L/P	razão molar entre concentrações de peptídeo e lipídeo ou entre concentrações de lipídeo e peptídeo
DEC	Decoralin	PS	fosfatidilserina
DEC-NH ₂	Decoralin amidado	Q	carga líquida
EM1~4	Eumenes micado 1 a 4	r	Grau de associação
EMP-AF	Eumenine mastoparano-AF	rc	estrutura aleatória ou randômica
EUM	Eumenitin	RMN	ressonância magnética nuclear
f_H	fração de hélice- α	SDS	dodecilsulfato de sódio
<H>	hidrofobicidade média	SUV	vesícula unilamelar pequena
[Lip]	concentração molar de lipídeo	T _c	temperatura de transição de fase do lipídeo
lpc	lisofosfatidilcolina	TFE	trifluoroetanol
lpg	lisofosfatidilglicerol	% V	% vazamento
LPS	lipopolissacarídeo	% V _{max}	constante % vazamento máximo
LUV	vesícula unilamelar grande		
MIC	concentração inibitória mínima		
MP	Mastoparano		
MP1	Polybia MP1		
MP-B	Mastoparano B		

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Representação esquemática dos parâmetros que podem afetar a estruturação dos PAMs helicoidais (Tossi et al., 2000).	12
2	Representação esquemática dos modelos propostos para o mecanismo de ação dos PAMs helicoidais (Tossi et al., 2000).	21
3	Modelos de poro (a) barril e (b) toroidal de acordo com Huang, 2000.	23
4	Espectros de CD de EMP-AF a 10 μM , 25°C em diversos ambientes.	35
5	Dependência do teor de hélice- α (f_H) a 25°C, pH 7,5 com (a) concentração de peptídeo e (b) razão L/P em vesículas PC.	36
6	Cinética do vazamento de vesículas PC (150 μM) e PCPG 7030 (95 μM) causado pela interação com EMP-AF, a 25°C.	37
7	Curvas de dose-resposta a 25°C para EMP-AF em (a) 150 μM PC e (b) 90 μM PCPG 7030, com diferentes tempos de contato.	39
8	Espectros de CD de Eumenitin a 8.5 μM , 25°C, em diferentes ambientes.	41
9	(a) Dependência do teor de hélice- α (f_H), com a razão L/P para Eumenitin em diferentes concentrações. (b) Partição (r) ou razão entre as concentrações de peptídeo ligado e lipídeo, PCPG 7030, em função da concentração de peptídeo livre.	42
10	Curvas de dose-resposta, a 25°C, para Eumenitin em vesículas aniônicas e em vesículas zwitteriônicas.	44
11	Espectros de CD dos peptídeos da série EMP-EM1~4, sendo (a) EM1, (b) EM2, (c) EM3, e (d) EM4, em diferentes ambientes, a 25°C.	46
12	(a) Espectros de CD, a 25°C, de EMP-EM1 (preto), EMP-EM2 (vermelho), EMP-EM3, (verde) e EMP-EM4 (azul) em CTACl 2,8 mM. (b) Dependência do teor de hélice- α (f_H) dos peptídeos (■) EM1, (●) EM2, (▲) EM3 e (▼) EM4 com a razão entre as concentrações de lipídeo e peptídeo (L / P).	47
13	Curvas de dose-resposta, a 25°C, para EM1 e EM2 (a) e para EM3 e EM4 (b) em PCPG 7030 23 μM (símbolos cheios) e 33 μM (símbolos vazados), após 3 minutos de contato.	48
14	Curvas de dose-resposta, a 25°C, para EM1, EM2, EM3 e EM4, em PC 54 μM com 5 minutos de contato.	49
15	(a) Gráfico da constante de tempo (τ) da cinética de vazamento induzido por EM1 (preto), EM2 (vermelho), EM3 (verde) e EM4 (azul) em vesículas aniônicas, PCPG 7030, em função da concentração P/L mínima. (b) idem para vesículas zwitteriônicas, PC.	50
16	Cinética do vazamento induzido por EM1~4 em vesículas (a) 54 μM PC e (b) 23 μM PCPG 7030, na presença de CTACl em concentrações equimolares em relação aos peptídeos, a 25°C.	51
17	Cinética da interação de peptídeos catiônicos, EMP-AF e EM3, a 5 μM com vesículas PC 11 μM , na ausência e na presença de surfactante aniônico, SDS a 165 μM , a 25°C.	52
18	Espectros de CD de MP1 a 20 μM , 25°C: (a) em ambientes anisotrópicos e (b) na presença de vesículas.	53
19	Espectros de fluorescência de MP1, a 25°C, na presença de tampão Tris e na presença de vesículas PC.	55
20	(a) Cinética do vazamento de vesículas induzido pela interação com MP1 5 μM , 25°C, em (◆) PC, (▲) PCPG 7030, (◻) PCCL 7030, (○) PCCL 4060, e a 20 μM em (■) PCCL 7030 (●) PCCL 4060.	56

	(b) % Vazamento máximo (símbolos cheios) e constante de tempo (τ , símbolos vazados) obtidos pelo ajuste da curva de cinética de MP1 para as mesmas vesículas nas respectivas razões [Pep]/[Lip].	
21	Curvas de dose-resposta para MP1, após 5 minutos de contato, em função da concentração de peptídeo (a) e da razão L/P (b) em vesículas zwitteriônicas e aniônicas, a 25°C.	57
22	Espectros de CD, a 25°C, de (a) Anoplin-NH ₂ e (b) Anoplin-OH a 10 μ M, em diferentes ambientes.	59
23	Dependência da fração de hélice- α de Anoplin-NH ₂ (\blacktriangle) e de Anoplin-OH (\blacktriangle) com a concentração de SDS; (b) Dependência da fração de hélice- α com a concentração de Anoplin-NH ₂ em tampão PBC, pH 7,5 (\blacksquare) e em solução tamponada de SDS 8 mM (\bullet) comparativamente a Anoplin-OH em tampão () e em SDS (\circ). (c) Dependência da fração de hélice- α com a razão molar entre as concentrações de lipídeo e peptídeo ([Lip]/[Pep]) para Anoplin- NH ₂ a 10 μ M (\blacksquare), 20 μ M (\blacktriangle) e 25 μ M (\blacktriangledown) em vesículas PCPG 7030.	61
24	% vazamento induzido por (a) Anoplin-NH ₂ e (b) Anoplin-OH em vesículas aniônicas, a 25°C.	62
25	(a) Cinética do vazamento de vesículas PCPG 4060 a 120 μ M induzido por 5 μ M e 20 μ M de Anoplin-NH ₂ (\blacksquare) e Anoplin-OH (\blacktriangle); (b) idem em 150 μ M PC para Anoplin-NH ₂ e Anoplin-OH.	63
26	Curvas de dose-resposta para Anoplin-NH ₂ (\blacksquare) e Anoplin-OH (\bullet) após 15 minutos de contato, em função da concentração de peptídeo, em vesículas PCPG 7030 90 μ M.	64
27	Espectros de CD a 25°C de Decoralin (a) e de Decoralin-NH ₂ (b) a 8.5 μ M, em diferentes ambientes.	65
28	Espectros de CD a 25°C de Decoralin e Decoralin-NH ₂ a 8.5 μ M em vesículas zwitteriônicas e aniônicas.	66
29	(a) Espectros de CD de DEC-NH ₂ obtidos variando-se a concentração de peptídeo entre 0,1 e 30 μ M e mostrando o ponto isodicroico em 203 nm. (b) Gráfico da elipticidade molar ($[\Theta_{222}]$) em água (\bullet) e em SDS 8 mM (\blacksquare) em função da concentração.	66
30	Projeções helicoidais dos peptídeos DEC e ANP mostrando suas possíveis estruturas anfipáticas e ângulos polares.	68
31	Curvas de dose-resposta para (a) Decoralin (b) Decoralin-NH ₂ em vesículas \blacksquare PCPG 7030, \bullet PCPG 4060, \blacktriangle PCCL 7030, \blacktriangledown PCCL 4060 e \star PC.	69
32	Gráfico da constante de tempo (τ) observada nos vazamentos induzidos por DEC (\blacksquare) e DEC-NH ₂ (\bullet), em vesículas PCPG 7030 (preto), PCPG4060 (vermelho), PCCL7030 (verde), PCCL4060 (azul) e PC (azul claro) e, símbolos cheios em função da concentração P/L mínima em que as respectivas curvas da cinética foram ajustadas.	70
33	Comparativo de vazamento induzido por peptídeos de cadeia curta em vesículas PCPG 7030, 90 μ M, após 5 e após 20 minutos de contato. ANPs na concentração de 15 μ M e os demais a 10 μ M.	71
34	(a) Gráfico da relação entre hidrofobicidade média e elipticidade em meio SDS 8 mM. (b) Gráfico da relação entre hidrofobicidade média e momento hidrofóbico. (c) Gráfico da relação entre elipticidade em meio SDS 8 mM e momento hidrofóbico.	74 74 75
35	Gráfico da constante de tempo (τ) observada nos vazamentos induzidos pelos peptídeos líticos em vesículas aniônicas, PCPG 7030, em função da concentração P/L mínima em que as respectivas curvas da cinética foram ajustadas.	76
36	(a) Gráfico da relação entre hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$) dos peptídeos (dados da Tabela 11) e o produto $\tau \times P/L$. (b) idem entre momento hidrofóbico (μ) e $\tau \times P/L$. (c) idem entre fração de hélice- α (f_H) e o produto $\tau \times P/L$. (d) idem entre ângulo da face polar (ϕ) e $\tau \times P/L$. (e) idem entre a concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos para bactérias Gram-positivas (símbolos cheios) e Gram-negativas (símbolos vazados) e o produto $\tau \times P/L$. (f) idem entre ângulo da face polar (ϕ) e o momento hidrofóbico (μ).	77 78 79

ÍNDICE DE TABELAS

1	Seqüência primária e Peso Molecular dos peptídeos estudados.	33
2	Características estruturais de EMP-AF e seus análogos, inclusive fração de hélice- α , em diversos ambientes, a 10 μM .	35
3	Constantes V_{max} e τ obtidas para as cinéticas de interação de EMP-AF, a 25°C, em vesículas PCPG 7030 90 μM e PC 150 μM .	38
4	% Vazamento (%V) de vesículas zwitteriônicas (PC) e aniônicas (PCPG 7030) induzido por EMP-AF e seus análogos, a 25°C, após diferentes tempos de contato (em segundos).	38
5	Propriedades estruturais de Eumenitin (8.5 μM) em comparação a EMP-AF (10 μM), e suas respectivas frações de hélice- α (f_H) em diferentes ambientes.	42
6	Constantes % V_{max} e τ obtidas para a cinética da interação do Eumenitin em vesículas PCPG 7030 e PC.	43
7	Propriedades estruturais de EMP-EM1~4 (10 μM) em comparação a eumenitin (8,5 μM) e EMP-AF (10 μM), e suas respectivas frações de hélice- α (f_H).	48
8	Características estruturais de MP1, inclusive fração de hélice- α , em diversos ambientes, a 20 μM , comparativamente a EMP-AF, MP-B e MP-X.	54
9	Elipticidade molar ($[\Theta]_{222}$, deg cm^2/dmol) em 222 nm e correspondente fração de hélice- α para ANP-NH ₂ e ANP-OH a 20 μM (f_H) e a 10 μM (f_{H10}), em diferentes ambientes.	60
10	Comparativo da fração de hélice α (f_H) de Decoralin e seu análogo, a 8,5 μM , com outros peptídeos curtos a 10 μM , em diferentes condições.	67
11	Características estruturais e atividade biológica dos peptídeos.	73

RESUMO

Neste trabalho estudamos a conformação em ambientes anisotrópicos e a atividade lítica em vesículas aniônicas e zwitteriônicas de um conjunto de peptídeos biologicamente ativos, extraídos de veneno de vespas solitárias, que se caracterizam por usar seus venenos para paralisar as presas com as quais alimentam suas larvas. Esses peptídeos que são desgranuladores de mastócitos, apresentam atividade antimicrobiana e a maioria deles não é hemolítica. Possuem entre 10 e 15 resíduos, são catiônicos, com alta proporção de resíduos carregados e polares, e são lineares e helicoidais em meios miméticos de membranas. Buscamos correlacionar a atividade lítica em vesículas de diferentes composições, analisada em experimentos de fluorimetria, às mudanças conformacionais, induzidas por diferentes ambientes miméticos, monitoradas por dicroísmo circular, complementando com a análise das características físico-químicas como comprimento da cadeia, amidação do terminal-C, carga líquida, influências no macrodipolo da hélice, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e ângulo polar. Observamos que estes peptídeos apresentam intensa atividade em membranas modelo, interagem preferencialmente com bicamadas aniônicas, e sua atividade lítica acontece de modo cooperativo tanto em vesículas aniônicas como nas zwitteriônicas. Com exceção de Anoplin, todos os peptídeos com ação antimicrobiana apresentam curvas de dose-resposta que mostram uma dependência sigmoide com a concentração do peptídeo. Isso sugere que esses peptídeos se acumulam na superfície da vesícula até atingir uma concentração crítica, além da qual o vazamento aumenta cooperativamente. De uma forma geral os peptídeos mais eficientes como antimicrobianos, são também aqueles caracterizados pela maior eficiência em permeabilizar vesículas aniônicas do tipo PCPG 7030 e por baixas razões limite P/L. Essas características nos levam a sugerir que a atividade lítica dos peptídeos deste estudo provavelmente acontece por um mecanismo semelhante ao descrito no modelo do poro toroidal. E ainda, que os peptídeos líticos e antimicrobianos estudados interagem preferencialmente com a região das cabeças dos fosfolípidos, formando poros cuja estrutura mista, lípido / peptídeo expõe os resíduos polares e carregados ao solvente aquoso.

Palavras-chave: Peptídios de veneno de vespa. Peptídios antimicrobianos. Mastoparano. Lipossomos. Atividade lítica. Dicroísmo circular

ABSTRACT

Solitary wasps use their venoms to paralyse preys to feed their larvae. A set of biologically active peptides, obtained from these venoms, have been investigated in relation to the conformational changes they undergo in anisotropic environments and their lytic activity on zwitterionic and anionic vesicles. These peptides are mast cell degranulators, present antimicrobial activities and most of them are not hemolytic. They are cationic, their chain length are 10 to 15 residues long, with high hydrophilic / hydrophobic ratio; they are linear and helical in membrane mimetic environments. We searched correlation between the lytic activity in vesicles of different compositions, monitored in fluorimetric experiments, and conformational changes, induced by varied mimetic media, monitored by circular dichroism. The results have been also correlated with peptides' physical-chemical parameters such as chain length, amidated or carboxylated C-terminal, net charge, influences on the helix macrodipole, hydrophobicity, hydrophobic moment and polar angle. We observed that these peptides present intense activity on model membranes, they interact preferentially with anionic bilayers, and their lytic activity is a cooperative process either in anionic or in zwitterionic vesicles. Exception made to Anoplin, all the other peptides that have antimicrobial activity present in their dose-response curves a sigmoidal dependence with the peptide concentration. This fact suggests that these peptides accumulate on the vesicles surface until they reach a threshold concentration, beyond which leakage increases cooperatively. As a general rule, the most efficient antimicrobial peptides are also those characterized by efficient permeabilization of anionic vesicles, namely PCPG 7030 and by small threshold P/L ratios. These features make us suggest that the lytic activity of the peptides in this study probably takes place through a mechanism similar to that described in the toroidal pore model. Moreover, these lytic and antimicrobial peptides interact preferentially with phospholipids head group region, forming pores whose mixed structures are made of lipids and peptides, with polar residues being exposed to the aqueous solvent.

Key words: Wasp venom peptides. Antimicrobial peptides. Mastoparan. Liposomes. Lytic activity. Circular dichroism.

1. INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares o sistema imunológico inato é responsável pela forma mais rápida de resposta para controlar o surgimento de infecções. Ele se baseia na habilidade inerente das espécies em discriminar seus próprios constituintes dos agressores e é relativamente inespecífico (Hancock & Diamond, 2000). Peptídeos antimicrobianos de todas as espécies desde plantas até mamíferos são integrantes desse sistema (Zasloff, 2002; Andreu & Rivas, 1998; Matsuzaki, 1999a e 2001; Shay, 1995, Epanand & Vogel, 1999). A grande maioria foi encontrada em células epiteliais contribuindo para a defesa dos organismos nesta primeira barreira (Zasloff, 2002). Um único animal pode possuir diferentes tipos de peptídeos e isso sugere que seus espectros antimicrobianos sejam complementares, que eles possam agir em sinergia, e que sejam produzidos naqueles tecidos onde sejam mais necessários e eficientes (Hancock & Diamond, 2000).

Centenas de peptídeos antimicrobianos já foram isolados e independentemente da sua origem, perfil de atividades biológicas e variabilidade estrutural eles apresentam diversas características comuns: são constituídos por menos de 60 resíduos de aminoácidos, geralmente aminoácidos L, possuem carga líquida positiva em pH fisiológico, são anfipáticos e a grande maioria apresenta algum tipo de atividade sobre membranas. Estudos realizados tanto em organismos vivos como em membranas modelo indicaram que os peptídeos antimicrobianos aumentam a permeabilidade da membrana plasmática e que existe correlação direta entre efeito antibiótico e de permeabilização (Andreu & Rivas, 1998). Tanto interações eletrostáticas como efeitos hidrofóbicos foram reconhecidos como determinantes desses processos.

Embora possam ocorrer interações com receptores na membrana, o alvo dos peptídeos antimicrobianos são os fosfolipídeos constituintes dessa mesma membrana (Yeaman & Yount, 2003; Papo & Shai, 2003b), através de mecanismo que não é ainda completamente compreendido. A interação entre peptídeos antimicrobianos e fosfolipídeos da membrana que causa sua desestruturação, levando à lise da célula, se revela bastante vantajosa, pois a constituição lipídica da membrana foi conservada durante a evolução (Zasloff, 2002; Yeaman & Yount, 2003), além de apresentar significativa diferença entre microrganismos e células de eucariotos. Isso dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos microrganismos (Zasloff, 2002). Não é difícil assim imaginar as possibilidades vislumbradas de se empregar peptídeos antimicrobianos em antibioticoterapia, principalmente em face do surgimento de novas cepas, de maior virulência, resistentes aos antibióticos convencionais (Powers & Hancock, 2003; Yeaman & Yount, 2003).

Três modelos foram propostos para explicar a atividade lítica destes peptídeos por Matsuzaki (1999) e Shai (1999) e por Huang (2000). Embora apresentem diferenças fundamentais entre si, estes modelos podem ser sintetizados em um único modelo, como segue: o peptídeo liga-se, inicialmente, à superfície externa da membrana onde assume a conformação helicoidal, tendo o eixo da hélice

orientado paralelamente à bicamada. Nesta situação o peptídeo acumula na superfície externa da membrana até alcançar uma concentração crítica. Acima desta concentração ocorre a atividade lítica através da formação de poros toroidais transientes (Matsuzaki, 1999) e/ou de rompimento da bicamada (Shay, 1999). Ao atingir a concentração crítica, a orientação dos peptídeos em relação à bicamada muda e eles se orientam perpendicularmente a ela e formam poros toroidais ou poros com estrutura de barril (“barrel stave”, Huang, 2000). Observa-se que a concentração crítica para desencadear a atividade lítica é fortemente dependente dos lipídeos que compõem a membrana. Esta dependência está relacionada às características elásticas da bicamada (módulos de flexão e de compressibilidade) e à morfologia desses lipídeos da membrana (Harroun et al., 1999; Huang, 2000; Chen et al. 2003).

Compreender as razões pelas quais alguns peptídeos antimicrobianos, eliminam patógenos sem atingir as células do hospedeiro e por que cada um deles tem seu espectro particular de efeitos antibióticos vem sendo a força motriz da maioria dos estudos nessa área. Pesquisas dirigidas à composição e arquitetura da membrana fosfolipídica correm paralelamente aos estudos da influência das características estruturais dos peptídeos e esses são os caminhos que se apresentam para tentarmos melhorar a seletividade desses possíveis sucedâneos aos antibióticos convencionais.

Neste trabalho estudamos a conformação em ambientes anisotrópicos e a atividade lítica em vesículas aniônicas e zwitteriônicas de um conjunto de peptídios biologicamente ativos, extraídos de veneno de vespas solitárias, que se caracterizam por usar seus venenos para paralisar as presas com as quais alimentam suas larvas. Esses peptídios que são desgranuladores de mastócitos, apresentam atividade antimicrobiana e a maioria deles não é hemolítica. Possuem entre 10 e 15 resíduos, são lineares, e de estrutura aleatória em meio aquoso. Nossa proposta é entender quais características físico-químicas desses peptídeos, incluindo-se dentre elas a elipticidade, são importantes para atividade lítica e para a seletividade em relação a membranas zwitteriônicas e aniônicas; e quais as possíveis relações dessas características e da eficiência de permeabilização de vesículas com a atividade antimicrobiana em relação a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A cada dia cresce o número de novos peptídeos antimicrobianos que são encontrados em todos os tipos de organismos, o que levou a alguns estudos de sistematização (Andreu & Rivas, 1998; Epanand & Vogel, 1999), em geral baseados em classificações de acordo com a estrutura secundária ou pelo mecanismo de ação; se por um lado muitos desses peptídeos apresentam alta homologia em suas seqüências primárias, por outro lado, pequenas alterações nessas seqüências parecem conduzir a atividades biológicas diferentes, mais ou menos seletivas ou interessantes para aplicação em antibioticoterapia. Buscamos, assim, uma forma de analisar e entender essas pequenas diferenças.

Para isso estudamos por Dicroísmo Circular as mudanças conformacionais geradas por diferentes ambientes miméticos de membranas, tais como misturas TFE/água, soluções monomérica e micelar de SDS, e em vesículas zwitteriônicas e aniônicas. Os resultados de elipticidade foram analisados e comparados entre os peptídeos deste estudo, considerando-se também os seguintes

parâmetros físico-químicos que os caracterizam: observamos a influência do tipo e número de resíduos na seqüência primária, a influência da natureza do terminal-C, amidado ou carboxilado, do número e distribuição de resíduos carregados e a somatória desses efeitos no macrodipolo da hélice. Buscamos, ainda, correlacionar a atividade lítica em vesículas de diferentes composições, analisada em experimentos de espectroscopia de fluorescência, aos resultados obtidos nas análises conformacionais e, ambos, à hidrofobicidade média, à anfipaticidade estimada pelo cálculo do momento hidrofóbico, à extensão da face (ângulo) polar na hélice anfipática, e à atividade antimicrobiana. Esses parâmetros têm sido objeto de extensos estudos que procuram estabelecer conexões entre estrutura, atividade biológica e possíveis mecanismos de ação desses peptídios (Dathe et al., 2002), visando o desenho de novas drogas com ação antibacteriana, menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O objetivo desta pequena revisão é construir um cenário básico onde as atividades biológicas dos peptídeos antimicrobianos helicoidais possam ser discutidas sob o enfoque de suas características físico-químicas e da sua forma única de interagir com membranas, que resulta ao mesmo tempo em um modo de ação não-específico (independente de receptores), mas altamente seletivo.

2.1 Atividade biológica

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem um universo em contínua expansão, como se pode verificar consultando os bancos de dados <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm> e <http://aps.unmc.edu/AP/main.html>, e para essa expansão toda sorte de seres vivos parecem contribuir. O que mais chama a atenção e explica o crescente interesse é a impressionante variedade de atividades já descritas, além da ação antimicrobiana (Tossi et al., 2000), que ao diferenciar-se entre os organismos aumenta a especificidade e efetividade das respostas do sistema imune (Hancock & Diamond, 2000). PAMs são ativos em vivo com amplo espectro para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos, em baixas concentrações, tanto em condições de baixa ou alta força iônica; eles agem rapidamente, são bons agentes quimiotáticos, neutralizam lipopolissacarídeos de membranas bacterianas com atividade antiendotóxica, e em combinação com antibióticos podem agir sinergicamente (Scott et al., 1999; Zasloff, 2002; Yeaman & Yount, 2003), participam do sistema imunológico inato, inclusive de respostas inflamatórias (Hancock & Diamond, 2000; Hoffmann et al., 1999), promovem a cicatrização, possuem ação antiparasita, anti-câncer e antivírus com envelopes (Powers & Hancock, 2003). Eles interferem com o acesso de patógenos a receptores nas células hospedeiras e recrutam leucócitos aos locais infectados (Yeaman & Yount, 2003). Apresentam efeitos colaterais limitados (Brogden et al., 2003) e não induzem resistência facilmente (Zasloff, 2002).

Numa mesma espécie de organismo foram encontradas diferentes classes de PAMs, incluindo diversos análogos. As razões para essa variedade sugerem que seu campo de ação possa ser complementar, agindo em sinergia entre si contra os microrganismos, e sendo produzidos localmente por diferentes tipos de células (Hancock & Diamond, 2000). Sinergia e produção localizada pode ser a forma de limitar a toxicidade às células hospedeiras, diminuir as concentrações inibitórias, agir em sinergia com os constituintes do micro-ambiente e melhorar a eficiência (Yeaman & Yount, 2003). Explicações sobre as razões pelas quais um único peptídeo não poderia ser capaz de eliminar diferentes microrganismos podem estar no arsenal de lipídeos que compõem as membranas (Yeaman & Yount, 2003).

O fato de aminoácidos hidrofóbicos serem os principais constituintes dos PAMs sugere que a interação com a membrana bacteriana anfipática seja parte de seu mecanismo de ação. A conservação do caráter catiônico desses peptídeos, ao longo da evolução dos organismos de todas as espécies, evidencia também a importância das interações eletrostáticas para promover o primeiro contato e

modular as forças de ligação e a dinâmica subsequente. Forças eletrostáticas são as de maior alcance e resíduos como Lisina e Arginina podem orientar suas cargas para as cabeças aniônicas dos fosfolípidos das membranas externas das bactérias. O conjunto de forças eletrostáticas que direcionam a interação é complementado pelo potencial transmembranar negativo, inerente à maioria dos patógenos bacterianos (Yeaman & Yount, 2003).

Evidências sobre a forma como os PAMs eliminam microrganismos sem afetar as células hospedeiras apontam para diversas possibilidades, mas, claramente, a maioria delas está ligada a características da membrana bacteriana que diferenciam sua susceptibilidade (Andreu & Rivas, 1998), tais como: o potencial transmembranar que sofre despolarização, a composição que leva à ruptura com vazamento subsequente do conteúdo celular, a arquitetura passível de perturbações na distribuição dos lipídeos da bicamada (Yeaman & Yount, 2003), todas essas características conduzindo a falhas nas funções da membrana; e ainda, o início de processos que degradam a parede celular e a internalização do peptídeo propiciando o ataque às estruturas celulares (Scott et al., 1999). No entanto, há também muitas evidências de outros mecanismos de ação que conduzem à morte celular e que não estão diretamente ligados à integridade da membrana (Powers & Hancock, 2003; Yeaman & Yount, 2003; Park, et al., 2000; Andreu & Rivas, 1998). A carga negativa relativamente alta dos ácidos nucleicos os tornam alvos para os peptídeos catiônicos (Yeaman & Yount, 2003).

A base para a seletividade dos PAMs em relação às membranas bacterianas parecem ser a composição lipídica, em geral aniônica, característica das camadas externas dessas membranas, e a existência de um significativo potencial elétrico transmembranar (negativo, orientado para dentro, de -130 a -150 mV) que o diferencia das membranas de eucariotos (Hancock, 1997; Matsuzaki et al., 1999b). Peptídeos que não são catiônicos, como a alameticina, são menos seletivos entre células de bactérias e de mamíferos. Baixo nível de fosfolípidos aniônicos, próximo daquele encontrado em eucariotos já foi relacionado à resistência de algumas bactérias aos PAMs (Andreu & Rivas, 1998; Zasloff, 2002; Yeaman & Yount, 2003). Também a maior susceptibilidade de células tumorais à ação antibiótica de alguns peptídeos foi atribuída a uma maior exposição de resíduos de fosfatidilserina (Andreu & Rivas, 1998). Variações provocadas no nível de colesterol de eritrócitos resultaram numa relação inversa entre os níveis de esterol e a susceptibilidade aos PAMs (Andreu & Rivas, 1998). Entretanto, suas atividades são também afetadas por diferentes condições existentes *in vivo*, incluindo altas concentrações de cátions mono- e divalentes, poliânions, como heparina, plasma, lipopolissacarídeos (LPS), resíduos de ácido siálico e proteases (Andreu & Rivas, 1998).

Ainda assim, a maioria das atividades biológicas desses peptídeos está associada às características das membranas:

1. Infecções causadas por bactérias Gram-negativas introduzem toxinas no sangue devido à liberação de um componente da membrana externa, a endotoxina, ou lipopolissacarídeo. Sua toxicidade está contida na porção denominada lipídeo A do LPS. Peptídeos antimicrobianos catiônicos constituem uma alternativa para superar a infecção e a septicemia devido a sua capacidade

de ligação ao LPS. Embora os PAMs não sejam tão potentes como algumas drogas antibióticas recentes, eles apresentam vantagens potenciais, incluindo o aumento da atividade dessas drogas e a habilidade em bloquear a endotoxemia (Scott et al., 1999).

2. Peptídeos com atividade antifúngica, freqüentemente encontrados em plantas, são relativamente ricos em aminoácidos polares, não carregados, e, curiosamente, os esteróis que ocorrem principalmente em membranas eucarióticas, também são encontrados em fungos, mas não em bactérias (Yeaman & Yount, 2003).

3. A hemólise compreende duas etapas, uma de ligação e outra de lise. DeGrado et al. (1982) mostraram que a melitina, um peptídeo hemolítico e antimicrobiano do veneno de abelha, causa uma liberação bifásica de hemoglobina dos eritrócitos: a primeira, uma liberação rápida e parcial efetuada pelos peptídeos ligados à superfície dos eritrócitos, acoplada à penetração da melitina à membrana e, uma segunda fase, mais lenta da liberação dos conteúdos citoplasmáticos, causada pela forma dimérica da melitina ligada à membrana.

4. PAMs como magaininas, defensinas, NK-lisinas, BMAP-27 e BMAP-28 mostraram ser ativos em células tumorais de mamíferos (Risso et al., 1998). BMAPs são peptídeos de origem bovina da família das catelicidinas, cuja natureza catiônica lhes permite interagir com lipídeos negativamente carregados ou com proteínas de membranas, ou com resíduos siálicos. BMAPs apresentam seletividade a células alteradas ou em proliferação contra células em repouso e causam a morte programada de linhas de células humanas alteradas e de linfócitos ativados. Disparar o mecanismo de apoptose pode ser uma forma de eliminar células indesejadas (Risso et al., 1998).

5. A ação antiparasita dos PAMs é bem representada pelo seu efeito leishmanicida. Temporinas são exemplos de PAMs que agem tanto nos estágios da *Leishmania* em insetos como em mamíferos. Esta última forma, os promastigotos, são envolvidos por uma camada de glicocalix, composta predominantemente por lipofosfoglicanas, uma molécula aniônica ligada à membrana por glicosilfosfatidilinositol. Embora as temporinas sejam pouco capazes de ultrapassar a camada de LPS das bactérias Gram-negativas, elas conseguem atravessar a camada de glicocalix e atingir a membrana da *Leishmania* (Mangoni et al., 2005). Outros PAMs como indolicidina, híbridos curtos de cecropina-melitina e dermaseptinas que também são leishmanicidas parecem agir por outros mecanismos. Dermaseptinas DS3 e DS4 são ativos contra *Plasmodium falciparum* de uma maneira especialmente seletiva: em células infectadas eles interagem diretamente com o parasita intracelular e em células não infectadas eles permanecem ligados à membrana plasmática dos eritrócitos. DS3 não é hemolítico e DS4 é hemolítico, correspondentemente, DS3 não permeabiliza vesículas PC e DS4 sim. Ambos são igualmente eficientes em permeabilizar vesículas aniônicas (Ghosh et al., 1997).

PAMs também são reconhecidos como parte integrante do sistema imunológico desde plantas até mamíferos (Zaslhoff, 2002; Andreu & Rivas, 1998; Matsuzaki, 1999a e 2001; Shay, 1995, Epan & Vogel, 1999), desde que Boman et al., em 1981, os encontrou na traça *Hyalophora cecropia*. (Hoffmann et al., 1999; Nordahl et al., 2004). Eles estão envolvidos em reações inflamatórias agudas

que são parte das defesas imunológicas, incluindo liberação de agentes inflamatórios pela lise de células bacterianas, desgranulação de mastócitos e liberação de histamina, e aumento da quimiotaxia (Zasloff, 2002).

2.1.1 Mastoparanos

Mastoparanos são peptídeos desgranuladores de mastócitos (Argiolas & Pisano, 1983; Hirai et al., 1979; Nakajima et al., 1986; Katsu et al., 1990; Mendes et al., 2005), extraídos de insetos da família *Vespidae* (Nakajima, 1986), que além de serem antimicrobianos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como: ação hemolítica (Argiolas & Pisano, 1983; Nakajima et al., 1986; Konno et al., 2000; Mendes et al., 2005 e 2004), aumento da ação quimiotática para macrófagos humanos e leucócitos polimorfonucleares (Souza et al., 2005; Nakajima et al., 1986), ligação à calmodulina (Nakajima et al., 1986), regulação da proteína G (Higashijima, T. et al., 1990), estimulação da fosfolipase A₂ (Argiolas & Pisano, 1983) e da fosfolipase C (Katsu et al., 1990), e permeabilização de bicamadas planares a cátions (Katsu et al., 1990; Nakajima et al., 1986;).

A classe dos mastoparanos foi assim denominada devido ao seu primeiro alvo reconhecido, os mastócitos. Estes e os basófilos são parte do sistema imunológico e responsáveis pelas reações alérgicas (Ivanova et al., 2001; Triggiani et al., 2000). Como parte deste sistema eles reagem defendendo contra infecções por bactérias ou parasitas, mas também estão envolvidos em algumas desordens cardiovasculares, neurológicas e gastrointestinais (Triggiani, et al., 2000). Quando acionados os mastócitos liberam substâncias como a histamina dos basófilos, serotonina das plaquetas, catecolaminas e ácidos adenílicos de células adrenais, citocinas e produtos recém produzidos como prostaglandina D₂, leucotrieno C₄ e hidroxi-ácidos graxos. (Engels et al., 1997; Nakajima et al., 1986).

Mastoparanos estão entre os constituintes dos venenos de vespas da ordem *Hymenoptera* (Nakajima et al., 1986). Eles facilitam a ação da fosfolipase purificada, que causa mudanças na composição fosfolipídica da membrana e está associada à desgranulação de mastócitos. Fosfolipases que preferencialmente hidrolisam fosfatidilcolina (PC), provocam a desgranulação em células RBL-2H3, uma linhagem de mastócitos de mucosa (Ivanova et al., 2001).

Mastoparanos regulam as funções da proteína G de uma maneira semelhante à dos receptores. Eles ligam-se a sítios negativamente carregados da proteína G (Higashijima et al., 1990). Apresentam ainda forte afinidade por fosfolipídeos, assumindo uma conformação ordenada ao se ligarem a eles nas membranas das células-alvo. Assim, estes peptídeos podem assumir uma orientação adequada em relação às moléculas da proteína G e com isso aumentando a sua concentração efetiva na superfície da membrana, próximo às moléculas dos receptores. Os efeitos de ativação pelos mastoparanos são seletivos dentre as proteínas G (Wakamatsu, 1992).

Mastoparanos são peptídeos antimicrobianos catiônicos, com cerca de 14 aminoácidos, ricos em resíduos hidrofóbicos e a maioria deles apresenta o terminal-C amidado. Usualmente assumem

uma conformação helicoidal anfipática quando interagem com ambientes também anfipáticos. As Tabelas 1 e 11 (capítulo Resultados) mostram as seqüências primárias e algumas características estruturais dos mastoparanos discutidos neste trabalho.

2.2 Seletividade de peptídeos antimicrobianos

Experimentos de ligação de PAMs, compostos exclusivamente por aminoácidos D ou L, a membranas enfatizam o conceito de um mecanismo de ação independente de um receptor estereoespecífico (Wade et al., 1990; Oren & Shai, 1997; Papo & Shai, 2005; Braunstein et al., 2004).

Observações sobre a maneira como peptídeos nativos exercem sua ação *in vivo*, comparada com suas atividades *in vitro*, chamaram a atenção para o fato de que algumas vezes estes efeitos são muito mais intensos do que aqueles e vice-versa (Shai, 1999; Tossi et al., 2000; Dathe & Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999a; Yeaman & Yount, 2003). A razão fundamental está na extensão em que os PAMs podem distinguir patógenos de células hospedeiras, o que certamente está ligado a estruturas e funções inerentes a ambos tipos de células, tais como diversidade de composição, afinidade eletrostática, transição conformacional dos peptídeos e estado energético das células-alvo, os quais podem promover ou retardar os efeitos. Além disso, a seletividade pode estar ligada também à expressão localizada em determinados tecidos, e ao controle sinérgico, positivo ou negativo, juntamente com outros PAMs ou constituintes do microambiente (Yeaman & Yount, 2003). Peptídeos serão menos danosos a tecidos sensíveis do hospedeiro, se eles estiverem presentes apenas no local e no momento da necessidade. Um exemplo é a presença de PAMs potentes, menos seletivos e em concentrações relativamente altas dentro de fagócitos. Pelo processo de fagocitose os patógenos são internalizados nos fagócitos; a desgranulação dessas organelas é potencialmente perigosa para o hospedeiro, mas a eliminação interna de células patogênicas pode ser muito eficiente (Yeaman & Yount, 2003).

A seqüência primária dos PAMs e as características dos terminais-N e -C definem aspectos físico-químicos – como carga líquida, anfipaticidade, hidrofobicidade – e sua configuração tridimensional. Assim, alterações na seqüência primária podem ter forte influência na estrutura como um todo, afetando sua ligação a membranas, as mudanças conformacionais e o perfil de atividades biológicas (Dathe & Wieprecht, 1999). Esses aspectos são específicos de cada peptídeo na mesma medida em que torna distinta cada interação de um peptídeo com diferentes patógenos. A estrutura secundária dos PAMs, assim como a sua ausência, também se acredita que contribua para a seletividade. Peptídeos cujas análises espectroscópicas, por dicroísmo circular (CD) ou ressonância magnética nuclear (RMN), apresentam um perfil característico de estrutura desordenada, mudam sua conformação quando se ligam a membranas naturais ou membranas miméticas. Mudanças conformacionais, por exemplo, para hélice- α (dos Santos Cabrera et al., 2004), folha- β , auto-associação ou oligomerização (Ghosh et al., 1997) mostraram ser dependentes do ambiente da membrana e como tal funcionar seletivamente (Yeaman & Yount, 2003). Huang et al. (2000) chamou

atenção para o fato de que cada peptídeo tem seu próprio espectro de atividade biológica, e isso não pode ser apenas resultante de diferenças nas ligações eletrostáticas ou no potencial transmembranar. Ele e seus colaboradores mostraram ainda que a susceptibilidade da bicamada depende de uma razão limite entre as concentrações de peptídeo e fosfolipídeo (P/L) que conduz à lise, e que por sua vez, depende da composição lipídica dessa bicamada (Huang, 2000; Chen et al., 2002; Heller et al., 1998; Ludtke et al., 1994; Huang & Wu, 1991; Lee et al., 2005).

A importância da carga líquida positiva, característica dos PAMs em pH fisiológico, para seu modo seletivo de ação, se evidencia quando consideramos que membranas bacterianas apresentam um gradiente eletroquímico significativamente maior que as células de eucariotos. Este fato e o caráter, em geral, aniônico da camada mais externa dessas membranas compõem o conjunto de interações eletrostáticas que guiam a ação seletiva dos PAMs em relação a seus alvos.

2.2.1 Influência da composição, arquitetura e energia da membrana

A bicamada fosfolipídica forma a estrutura básica de todas as biomembranas, as quais apresentam um domínio hidrofóbico e um hidrofílico. As diferenças entre membranas celulares procarióticas e eucarióticas estão principalmente relacionadas à sua composição. Fosfatidilcolina, seu análogo esfingomielina (SM), e fosfatidiletanolamina (PE) são componentes zwitteriônicos que predominam nas membranas celulares eucarióticas, assim como os esteróis, colesterol e ergosterol, que em altas concentrações estabilizam a bicamada (Allende & McIntosh, 2003; Lohner & Prenner, 1999; Matsuzaki et al., 1995a), por aumentarem o ordenamento das cadeias acílicas e a espessura da bicamada (Killian, 1992). Membranas celulares de mamíferos, exceto humanos, são frequentemente ricas em SM e pobres em PE. Ao contrário, a camada externa das membranas celulares procarióticas tende a ser composta predominantemente por fosfolipídeos aniônicos como fosfatidilglicerol (PG), seu dímero, a cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), que são praticamente ausentes em membranas de mamíferos (Yeaman & Yount, 2003; Lohner & Prenner, 1999; Matsuzaki, 1998a). Em resumo, a camada externa das membranas celulares bacterianas tende a ser fortemente negativa e aquelas de mamíferos são em geral eletricamente neutras, constituindo-se um dos fatores que definem a seletividade dos PAMs.

O formato das moléculas de fosfolipídeos influencia seu empacotamento e a curvatura espontânea das bicamadas. Moléculas de forma cilíndrica como PC tendem a formar estruturas estáveis em bicamadas; moléculas de formato cônico como lisofosfatidilcolina (LPC) ou dodecilsulfato de sódio (SDS), com a área da cabeça polar maior que a área da seção transversal das cadeias acílicas, tendem a formar soluções micelares, com uma superfície de curvatura convexa positiva; moléculas de formato cuneiforme como PE tendem a formar superfícies com curvatura côncava, negativa, denominada fase hexagonal reversa. A energia de curvatura determina sua formação. Assim, duas forças opostas agem, curvatura e empacotamento (Lindblom & Rilfors, 1989; Killian, 1992). A área das cabeças polares é afetada pela hidratação e interações inter-

intramoleculares, enquanto a área dos hidrocarbonetos é afetada pelo comprimento e grau de insaturação das cadeias, e pela temperatura que promove ordenamento ou desordenamento em suas terminações. O peptídeo linear gramicidina interage fortemente com vesículas PC e praticamente não interage com PE. Embora ambos fosfolípidos sejam zwitteriônicos, as diferenças foram atribuídas à natureza das cabeças polares e ao empacotamento desses lípidos (Killian, 1992). A adição de peptídeos pode estabilizar ou não o balanço entre curvatura e empacotamento. Esse balanço também permite o rearranjo de membranas biológicas em importantes processos como encapsulamento e fusão.

A distribuição de fosfolípidos entre as camadas interna e externa da bicamada constitui sua arquitetura. Diferenças sutis em cada monocamada como na estequiometria da composição de fosfolípidos, na saturação das cadeias lipídicas, e na distribuição assimétrica influenciam a fluidez, a transição de fase, a distribuição de carga e a anfipaticidade de todo o sistema e, conseqüentemente, a forma e a intensidade como os PAMs interagirão com a membrana. Estudos focalizando as fases das membranas e a composição lipídica indicaram o papel de lípidos específicos na função normal da membrana, especialmente de lípidos do tipo não formador de bicamadas como PE (Powers & Hancock, 2003).

A distribuição assimétrica de carga na bicamada e gradientes eletroquímicos através da membrana que dependem do fluxo de prótons, criam um potencial transmembranar. Células de mamíferos normais apresentam uma diferença de potencial através da membrana na faixa de -90 a -110 mV, contrastando com células bacterianas cuja diferença de potencial varia com a fase de crescimento na faixa de -130 a -150 mV na fase logarítmica. Essa importante diferença entre células de mamíferos e microbianas inclui-se entre os orientadores da toxicidade seletiva e foi denominada “self-promoted uptake” (Hancock, 1997).

2.2.2 Influência dos lipopolissacarídeos (LPS) e da membrana externa das bactérias

As superfícies externas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam alta densidade de cargas negativas. Nas primeiras as membranas são ricas em ácidos teicóicos e teicurônicos formando uma parede de peptidoglicanos em múltiplas camadas. As membranas citoplasmáticas das bactérias Gram-negativas possuem um envoltório externo composto de lipopolissacarídeos negativamente carregados que consistem de uma cadeia de polissacarídios covalentemente ligada ao lípídeo A, o qual é responsável por efeitos tóxicos adicionais em infecções (choque endotóxico) causadas por este tipo de bactérias. O primeiro componente é hidrofílico e densamente empacotado, e a outra parte é hidrofóbica, aniônica, com seis cadeias de ácidos graxos por molécula, mantidas juntas, em parte, por cátions divalentes (Scott et al., 1999; Papo & Shai, 2005; Epanand & Vogel, 1999). Essa membrana externa é considerada uma barreira e a ela se atribui uma atividade antimicrobiana inferior de alguns peptídeos (Allende & McIntosh, 2003; Oren & Shai, 1997; Papo & Shai, 2005; Zhang et al., 2001; Bechinger, 1999). Scott et al.(1999), trabalhando com

peptídeos helicoidais híbridos de cecropina (da traça de seda) e melitina (do veneno de abelha) encontrou que alguns análogos com boas atividades antimicrobianas e antiendotóxicas também possuíam maior afinidade de ligação de LPS. Contrariamente, Papo & Shai (2005) trabalhando com LPS de diferentes fontes e dodecapeptídeos helicoidais sintéticos não encontraram correlação direta entre ligação a bicamadas de LPS e despolarização de membranas citoplasmáticas, com eliminação de bactérias Gram-negativas, embora exista correlação entre atividade biológica e eficiência de permeabilização de bicamadas de LPS. Nesses estudos mostrou-se a alta capacidade de ligação de peptídeos a LPS; em princípio, LPS na forma ligada pode ter sua ação tóxica neutralizada e essa é a base da atividade antiendotóxica dos PAMs.

2.3 Modulação da atividade na membrana e correlação com a atividade biológica

Uma correlação direta entre o efeito antibiótico e a habilidade em permeabilizar membranas, tanto em organismos vivos como em sistemas modelo, vem sendo encontrada para a maioria dos PAMs, como defensinas, magaininas, cecropinas, batenecinas ou dermaseptinas (Andreu e Rivas, 1998). Alguns casos de mecanismos de ação não-líticos foram descritos (Powers & Hancock, 2003; Yeaman & Yount, 2003; Park et al., 2000). Estudos da interação peptídeo-lipídeo mostraram que a inserção do peptídeo e as modificações no empacotamento da membrana estão correlacionados com as interações hidrofóbicas entre eles, e que as interações eletrostáticas estão correlacionadas à ligação e perturbação da superfície da bicamada, à desativação do poro, à translocação para a camada interna e à ruptura do potencial transmembranar, todos conduzindo à lise da membrana, ao vazamento do conteúdo celular e à morte celular (Kiyota et al., 1999; Park et al., 1995; Dathe et al., 1996). Parâmetros estruturais e o efeito de suas modificações vêm sendo estudados em função do seu papel modulador na seletividade e atividade dos PAMs (Yeaman & Yount, 2003; Giangaspero et al. (2001); Wieprecht et al., 1997a).

2.3.1 A conformação helicoidal

Dentre os PAMs mais estudados a maioria é helicoidal, como melitina, magainina e mastoparanos, apresenta atividade lítica e forma poros em membranas e vesículas (DeGrado et al., 1982, Matsuzaki et al., 1997b, 1995b e 1996a; Wiles et al., 2001). A hélice- α é termodinamicamente favorecida em ambientes de membrana, pois permite a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos amida e carbonila da cadeia peptídica. Além disso, promove interações de van der Waals favoráveis entre as cadeias laterais da hélice- α e os fosfolipídeos das membranas (Deber & Li, 1995).

Peptídeos antimicrobianos helicoidais são em geral lineares, possuem menos de 40 resíduos na cadeia, não contém resíduos de cisteína e algumas vezes apresentam uma dobra no meio da cadeia. Quando assumem a estrutura em hélice- α tornam-se anfipáticos (ou anfifílicos). Esse aspecto

estrutural tem um importante papel na ligação de peptídeos a membranas ou superfícies também anfipáticas. De acordo com DeGrado et al. (1982), hélices- α , como motivos estruturais, foram primeiramente demonstradas em apolipoproteínas da lipoproteína-3 de alta densidade do plasma humano; elas intercalam entre as cabeças polares dos fosfolipídeos da superfície das monocamadas, as quais envolvem o centro lipídico feito de triglicerídios e colesterol, estabilizando-o.

2.3.2 Aspectos estruturais

Apesar de serem produzidos por uma vasta gama de organismos, os PAMs compartilham padrões estruturais muito semelhantes, os quais são conhecidos por sua interdependência. Os mais importantes serão discutidos individualmente quando possível. A Figura 1 ilustra algumas das características estruturais que serão discutidas:

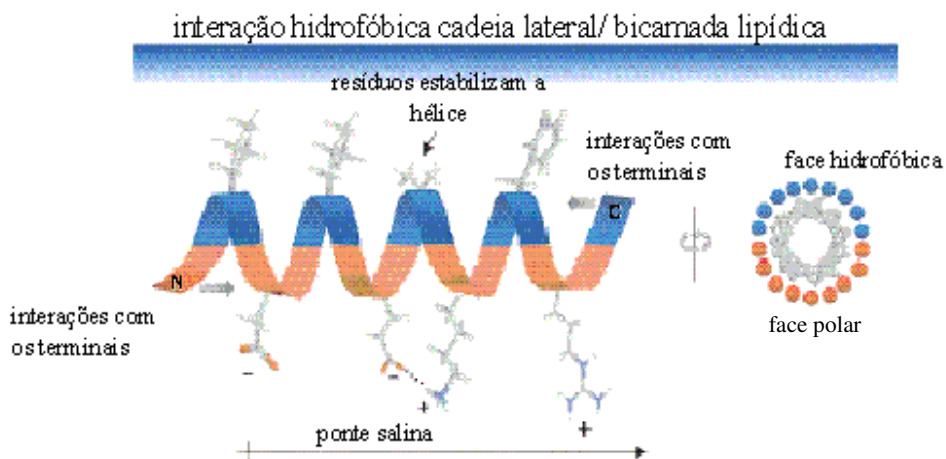


Figura 1: Representação esquemática dos parâmetros que podem afetar a estruturação dos PAMs helicoidais (Tossi et al., 2000).

2.3.2.1 Seqüência primária e comprimento da cadeia. Em peptídeos de cadeia curta as características de alguns resíduos de aminoácidos crescem em importância. Gly aumenta a flexibilidade da cadeia principal e favorece dobras desta (Andreu et al., 1992). Pro também é responsável por dobras na cadeia principal, entretanto sua cadeia lateral é quase rígida. Uma dobra causada por Pro na posição 11 em buforina II, um PAM de 21 resíduos, é considerada responsável pela habilidade deste peptídeo em penetrar células (Park et al., 2000). Val, Ile e Leu possuem cadeias laterais maiores, ramificadas e mais rígidas. Phe, Trp e Tyr apresentam flexibilidade restrita da cadeia lateral. Trp é levemente polar devido aos seu anel indol heterocíclico, e tem preferência por posições na interface polar/apolar (Schulz & Schirmer, 1978).

Resíduos polares não carregados como Ser e Thr, com seus grupos hidroxila, e Asn e Gln, com suas amidas ácidas, estão freqüentemente envolvidos em ligações de hidrogênio. O grupo

hidroxila polar de Tyr participa de fortes ligações de hidrogênio. Os resíduos carregados negativamente, como Asp e Glu, assim como os positivamente, Lys e Arg, podem se envolver em ligações salinas. Cadeias laterais de Lys e Arg são longas, flexíveis e hidrofóbicas, exceto nas terminações (Schulz & Schirmer, 1978).

Giargaspero et al. (2001) e Tossi et al. (2000) analisaram mais de 150 seqüências de PAMs, entre 16 e 40 resíduos na cadeia, produzidos por várias espécies, de insetos a mamíferos, limitando aos primeiros 20 resíduos a partir do terminal-N, e encontraram um padrão no tipo de resíduos – carregados, polares ou hidrofóbicos – de acordo com suas posições médias na cadeia. Foi observada conservação significativa para Gly nas posições 1, 7 e 14, e para Lys na posição 8. Gly 1 foi encontrado em 70% dos peptídeos pesquisados no banco de dados AMSDB (Tossi et al., 2000) e já havia sido considerado um resíduo que favorece a estrutura em hélice quando encontrado na posição 1 (Rohl & Baldwin, 1998). Resíduos alifáticos grandes foram encontrados formando a face hidrofóbica, e resíduos menores, como Ala, aparecem ao centro ou na região do terminal-C; resíduos aromáticos são raros, mas aparecem no terminal-N. Lys é o resíduo polar mais comum, seguindo por Ser na posição 4. Dessa forma eles propuseram o seguinte modelo:

Gly - H - H - ±np - +/np - H - X/Gly - ±np - X - H - ±np - +/np - H - H/Gly - +/np - + - H - X –
onde os resíduos indicados como H são hidrofóbicos, + são positivos, - são negativos, np são polares neutros, e X quando nenhum tipo de resíduo predomina na posição. Eles também encontraram que de 40 a 60% dos resíduos nas seqüências examinadas são hidrofóbicos.

O comprimento da cadeia nem sempre é pré-requisito para a atividade de peptídeos helicoidais, pois ação antimicrobiana já foi detectada em peptídeos com apenas 10 resíduos (Konno et al., 2001). Experimentos com deleção e/ou hibridização de cadeias peptídicas conduziram a resultados variados; alguns dos híbridos de cecropina-melitina com 30 a 60% de redução da cadeia apresentaram a mesma atividade antibacteriana que o peptídeo de partida com 26 resíduos (Andreu et al., 1992). Redução de 30% no comprimento da cadeia de EMP-AF aboliu a atividade antibacteriana (dos Santos Cabrera et al., 2004). Blondelle & Houghten (1992) mostraram que peptídeos sintéticos com cadeia de 11 a 17 resíduos exibiram maior atividade antibacteriana do que os análogos menores (até 8 resíduos) ou aqueles mais longos (até 22 resíduos). PAMs de cadeia curta, muito ativos são considerados modelos de balanço adequado entre carga elevada, teor de hélice, hidrofobicidade adequada e número correto de resíduos grandes alifáticos (Giargaspero et al., 2001).

2.3.2.2 Terminais-N e -C. As características dos terminais-N e -C são relativamente mais importantes para o teor helicoidal e para as atividades biológicas dos peptídeos de cadeia curta do que para outros tipos de peptídeos de cadeias mais longas (Scholtz et al., 1991), com vários exemplos na literatura. A adição de uma amina ao terminal-N de pequenos congêneres de SMAP-29 (um peptídeo encontrado nas células mielóides da medula óssea de ovelhas) aumentou suas atividades antimicrobianas; o grupo carboxila do terminal-C de cecropina-1 é determinante para sua atividade contra bactérias Gram-

negativas (Brogden et al., 2003); a amidagem do mesmo C-terminal em EMP-AF é necessária para a ação antimicrobiana (dos Santos Cabrera et al., 2004; Sforça et al., 2004).

A amidagem é provavelmente a mais freqüente modificação pós-translacional que ocorre em uma ampla variedade de peptídeos; ela envolve a descarboxilação oxidativa de um resíduo de glicina adicional. Isto previne a clivagem por carboxipeptidases, permite a acomodação do terminal-C, que deixa de ser negativamente carregado, em um ambiente não polar (Andreu & Rivas, 1998; Schulz & Schirmer, 1978), e provê uma ligação de hidrogênio a mais para a formação de hélices- α (Sforça et al., 2004). A correlação entre amidagem e atividade biológica varia de peptídeo para peptídeo: em alguns casos as formas amidadas ou não-amidadas não diferem substancialmente, mas em outros casos, a atividade pode ser significativamente modificada. Em diversos casos, análogos de peptídeos nativos que não são originalmente amidados apresentam atividade antimicrobiana aumentada (Shalev et al., 2002; Sitaram & Nagaraj, 1999; Andreu & Rivas, 1998).

Uma modificação comum do grupo amino do terminal-N é a acetilação ou formilação ou mesmo a conversão de um glutamato do terminal-N em um grupo carbonilpirrolidona, como ocorre em venenos de cobras. Essas modificações que alteram a carga do terminal-N podem evitar o ataque por aminopeptidases ou facilitar a introdução do terminal-N em um ambiente apolar (Schulz & Schirmer, 1978).

2.3.2.3 Macrodipolo da hélice e cargas. A presença de resíduos eletricamente carregados e polares ao longo da cadeia peptídica proporciona diferentes possibilidades de interação eletrostática, cujos efeitos na estabilização ou desestabilização da hélice são dependentes das suas posições relativas na cadeia (Shoemaker et al., 1985). Cada unidade peptídica tem um momento de dipolo de 3,5 D ($1,155 \times 10^{-29}$ Cm); em uma hélice- α a somatória dos dipolos dos grupos amida individuais, que estão alinhados quase paralelamente ao eixo da hélice, constitui o dipolo da hélice. Valores de até 5 D podem ser teoricamente alcançados com contribuições adicionais das ligações de hidrogênio que formam a hélice- α . O significativo campo elétrico de uma hélice- α é, portanto, gerado pelo macrodipolo que vai do polo negativo no terminal-C ao polo positivo no terminal-N (Hol et al., 1978), e esse campo depende da constante dielétrica do solvente (Joshi & Meier, 1996). Os seguintes efeitos foram atribuídos à influência geral do macrodipolo da hélice: resíduos positivamente carregados, quando situados próximos ao terminal-N (posição 2), parecem ser responsáveis por regiões desestruturadas (Park et al., 2000; dos Santos Cabrera et al., 2004). Assim como um resíduo Glu, negativamente carregado, próximo ao terminal-C carboxilado, parece instabilizar um segmento helicoidal no peptídeo Seminalplasmina, a deleção de uma Arg junto ao terminal-C amidado de indolicidina está relacionado à diminuição de atividades antimicrobianas e antifúngicas (Sitaram & Nagaraj, 1999). Por outro lado, Marqusee & Baldwin (1987) mostraram, em peptídeos projetados, que a presença de um Glu no terminal-N e de uma Lys no terminal-C facilita a formação da hélice por interações favoráveis entre as cargas e o dipolo da hélice; num outro exemplo, Park et al., 2000

mostraram que uma modificação que trouxe um resíduo Arg para a primeira posição resultou em um PAM mais eficiente que o peptídeo de origem. Em resumo, resíduos negativamente carregados próximos ao terminal-N da hélice, assim como resíduos positivamente carregados próximos ao terminal-C, favorecem as interações eletrostáticas com o dipolo da hélice (Shoemaker et al., 1985; Marqusee et al., 1989; Lyu et al., 1990; Deber & Li, 1995; Strop et al., 2000), e o aumento da helipticidade do peptídeo (Scholtz et al., 1993). O estado de ionização dos resíduos carregados também influencia a tendência de formação da hélice, aumentando sua estabilidade quando os resíduos carregados estão nas posições i , $i + 3$ ou i , $i + 4$, e quando a interação é entre resíduos não-ionizados e ionizados nas posições i , $i + 1$ ou i , $i + 2$ (Scholtz et al., 1993). Esses fatos indicam que a influência no macrodipolo da hélice depende da posição dos resíduos carregados.

Uma carga líquida variando entre +2 e +9 (Yeaman & Yount, 2003) ou de +4 a +6 (Tossi et al., 2000; Giangaspero et al., 2001) é uma característica comum entre PAMs e alguns deles, como melitina e buforina II, possuem um domínio catiônico definido. Cationicidade vem sendo considerada essencial para a atividade biológica, embora o número de cargas positivas requeridas para essa atividade varie de caso para caso (Sitaram & Nagaraj, 1999; Andreu & Rivas, 1998). A ação de peptídeos catiônicos em membranas de patógenos negativamente carregadas se inicia com a interação eletrostática entre eles; conseqüentemente, um aumento de cargas positivas no peptídeo deveria aumentar a atividade antimicrobiana (Matsuzaki et al., 1997a; Dathe et al., 1997; Andreu & Rivas, 1998;). Entretanto, alta densidade de carga pode acarretar outros efeitos como repulsão entre monômeros de peptídeo, o que limitaria a quantidade de peptídeo ligada ou desestabilizaria estruturas de poro pela proximidade desses monômeros. Em qualquer caso, o mecanismo de ação pode ser afetado.

De acordo com Dathe et al. (2001), o aumento do número de cargas positivas, dentro de certos limites, em análogos de magainina 2, com a manutenção das demais características estruturais, produziu aumento da atividade antimicrobiana. Além desses limites a atividade antimicrobiana diminuiu e surgiu atividade hemolítica; adicionalmente, peptídeos com alta cationicidade (+7) destruíram a integridade da camada externa de LPS em bactérias Gram-negativas. Outro exemplo semelhante foi observado em SPF, um segmento de 13 resíduos de aminoácidos do peptídeo seminalplasmina (SPLN): este segmento teve sua atividade antimicrobiana aumentada em cinco vezes, com amplo espectro, quando sua carga foi aumentada de +1 para +3, porém a inclusão de duas cargas positivas adicionais não melhorou sua ação antimicrobiana (Sitaram & Nagaraj, 1999). Uma redução de +5 para +3 na carga de peptídeos sintéticos com 19 resíduos também reduziu significativamente a atividade antimicrobiana, mas um aumento até +8 reduziu o espectro antimicrobiano e aumentou a atividade contra fungos; isto foi atribuído a uma redução do conteúdo helicoidal do análogo com carga +8 em relação a aquele com +5 (Giangaspero et al., 2001). Um mínimo de carga ao redor de +2 foi sugerido como necessário para a seletividade dos PAMs (Yeaman & Yount, 2003), por facilitar a interação inicial com membranas microbianas, transições na orientação

(formação de poro) e translocação de peptídeos para a membrana citoplasmática, além de favorecer o deslocamento de cátions ligados a membranas (Yeaman & Yount, 2003; Matsuzaki, 1998a; Andreu & Rivas, 1998).

2.3.2.4 Propensão helicoidal e elipticidade. O enovelamento em hélice de uma seqüência de aminoácidos é um processo cooperativo (Rohl & Baldwin, 1998), caracterizado pelos parâmetros de Zimm-Bragg, σ e s , respectivamente definidos como fator de nucleação e constante de propagação (Chou & Fasman, 1974; Gans et al., 1991). Cada resíduo de aminoácido tem suas próprias preferências conformacionais, e na seqüência, a somatória dessas preferências conduz à estabilização ou não da hélice- α (O'Neil, & DeGrado, 1990), dependendo do comprimento da cadeia (Marqusee et al., 1989; Gans et al., 1991), de restrições conformacionais estéricas das cadeias laterais (Deber & Li, 1995) e do ambiente (Blondelle et al., 1997; Waterhous & Johnson, 1994; Zhong & Johnson, 1992).

Alguns autores reconheceram que o equilíbrio hélice-coil dos resíduos de aminoácidos pode ser afetado por diferentes grupos vizinhos e pelo ambiente não aquoso, resultante do confinamento de alguns resíduos na estrutura terciária de uma proteína, ou ocasionado por interações não locais (Chou & Fasman, 1974; Waterhous & Johnson, 1994; Marqusee et al., 1989). Por exemplo, Val e Ile apresentam alta propensão pela conformação em folha- β , de acordo com o método de Chou & Fasman (1974), porém eles são freqüentemente encontrados em PAMs helicoidais e em segmentos helicoidais de proteínas de membrana, sugerindo, como proposto por Waterhous & Johnson (1994), que as características do ambiente como solvente podem suplantar a propensão intrínseca da seqüência. Deber & Li (1995) propuseram uma escala de propensão helicoidal baseada em medidas de elipticidade (CD) de um peptídeo “hospedeiro” de 20 resíduos, projetado para ser um modelo de proteína de membrana, e onde a influência da hidrofobicidade dos resíduos também foi considerada. Foram usados os seguintes meios aniônicos em tampão pH 7,0: solução micelar 10 mM de SDS, solução micelar 5 mM de lisofosfatidilglicerol (lpg) e vesículas 10 mM de dimiristoilfosfatidilglicerol; e ainda, foi determinada a variação no comprimento de onda de emissão da máxima fluorescência do único resíduo de Trp na seqüência, indicando que o segmento central do peptídeo interage efetivamente com o interior hidrofóbico de micelas de SDS. Nos três ambientes testados obteve-se a seguinte ordem decrescente de propensão helicoidal:

Ile>Leu>Val>Met>Phe>Ala>Gln>Tyr>Thr>Ser>Asn>Gly>Pro

que é bastante semelhante à ordem de hidrofobicidade decrescente dos resíduos, de acordo com a escala proposta por Eisenberg et al. (1984):

Ile>Phe>Val>Leu>Met>Ala>Gly>Tyr>Pro>Thr>Ser>Asn>Gln

Em SDS micelar, os resíduos Ile e Val que são ramificados no carbono β estão entre os mais fortes formadores de hélice. Além disso, eles calcularam a energia livre de formação da hélice relativa a Pro, a qual confirma sua escala de propensão.

Um estudo semelhante, conduzido por Blondelle et al. (1997), avaliou sistematicamente a propensão helicoidal de 19 aminoácidos naturais (exceto histidina, por problemas na obtenção do peptídeo) em meio aquoso tamponado, em SDS abaixo da cmc, considerado um meio mimético do interior de proteínas, em SDS acima da cmc e em micelas mistas de lisofosfatidilcolina e lisofosfatidilglicerol (lpc/lpg), considerados miméticos de membranas. Nesse estudo 9 aminoácidos apresentaram propensão para conformação em folha- β em meio SDS abaixo da cmc; dentre eles os peptídeos contendo Ala, Cys, Val e Tyr apresentaram mais de 85% de conformação em folha- β e Gly 55%. Como o peptídeo hospedeiro projetado não possui um segmento flexível que permitisse uma dobra na cadeia, os autores sugerem que essa conformação resulte de interações intermoleculares ou de interações entre a seqüência de resíduos de alanina do hospedeiro e as moléculas monoméricas de SDS, funcionando como um molde. Nos meios micelares de SDS e de lpc/lpg os 19 aminoácidos apresentam propensão helicoidal, o que pode ser explicado pela estabilização dessa conformação devido ao aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares no ambiente lipofílico do interior das micelas. Foram determinados, também, valores de elipticidade semelhantes para os diferentes resíduos nos dois ambientes sugerindo que as interações hidrofóbicas entre peptídeos e cadeias acílicas sejam responsáveis pela indução da conformação em hélice- α . Em meio SDS micelar a propensão helicoidal decresce na seguinte ordem:

Arg>Lys>Gln>Glu>Asn>Leu>Ile>Met>Ala>Asp>Tyr>Val>Gly>Thr>Cys>Trp>Ser>Phe>Pro

Observa-se que nesse ambiente os resíduos carregados apresentam maior propensão helicoidal que os resíduos hidrofóbicos; isso reflete a contribuição das interações eletrostáticas entre os grupos carregados e as cabeças aniônicas do SDS que podem facilitar a acomodação das porções hidrofóbicas das cadeias laterais junto às caudas hidrofóbicas de SDS. Observa-se também que dentre os resíduos carregados e polares a propensão helicoidal decresce com o comprimento das cadeias laterais, e portanto com a hidrofobicidade dessas cadeias. Nessa escala a hidrofobicidade intrínseca dos aminoácidos tem um efeito menor na propensão helicoidal. As diferenças entre esta escala e aquela proposta por Deber & Li (1995) é atribuída às diferenças na cadeia do peptídeo hospedeiro que produzem ambientes locais diferenciados.

O enovelamento em hélice parece ser um importante mecanismo da ação antimicrobiana, pois peptídeos helicoidais predominam no universo dos PAMs (Tossi et al., 2000). A elipticidade é decorrente da seqüência primária dos resíduos de aminoácidos (Deber & Li, 1995; Rohl & Baldwin, 1998) e da sua interação com o ambiente (Blondelle et al., 1997), que inclui a formação de ligações de hidrogênio na cadeia peptídica e interações de van der Waals e hidrofóbicas, contribuindo para a estabilidade da hélice (O'Neil & DeGrado, 1990). Em uma hélice- α , a formação do maior número possível de ligações de hidrogênio entre resíduos da cadeia peptídica favorece que o peptídeo busque as porções apolares da membrana (Eisenberg et al., 1984).

O teor helicoidal influencia a atividade do peptídeo em membranas negativamente carregadas, assim como em membranas zwitteriônicas; a redução da elipticidade pela perturbação da face hidrofílica mostrou ser negativa para o espectro de atividade antimicrobiana, entretanto, o aumento do teor helicoidal de uma estrutura já bem ordenada não resulta em eficiência antimicrobiana adicional (Giangaspero et al., 2001). De acordo com Dathe & Wieprecht (1999) e Giangaspero et al. (2001), a maior elipticidade correlaciona-se com aumento da atividade em relação a membranas zwitteriônicas. Resultados obtidos com peptídeos modelo sugeriram que a elipticidade é mais importante para a atividade do peptídeo em membranas zwitteriônicas do que para a permeabilização daquelas negativamente carregadas (Dathe et al., 1996).

2.3.2.5 Anfipaticidade e momento hidrofóbico. A hélice- α anfipática é a estrutura mais comum entre os PAMs, ideal para interagir com membranas biológicas igualmente anfipáticas. A anfipaticidade reflete a possibilidade que uma seqüência possui para formar domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, bem estruturados, em faces opostas. Segundo Eisenberg et al. (1984) o momento hidrofóbico representa uma medida quantitativa da anfipaticidade e é dado por:

$$\mu_H = \frac{\left[\left(\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right)^2 + \left(\sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right)^2 \right]^{1/2}}{N},$$

onde H_n é a hidrofobicidade do n-ésimo resíduo e δ é 100° , assumindo que 100% das cadeias laterais projetam-se perpendicularmente ao eixo da hélice em intervalos regulares de 100° , isto é, como uma hélice- α ideal.

Uma pesquisa entre os PAMs mostrou que o momento hidrofóbico, assim calculado, varia de 0,45 a 0,60 (Giangaspero et al., 2001; Tossi et al., 2000). Em peptídeos modelo e magainina, Dathe et al. (1997 e 2002) mostrou que o aumento do momento hidrofóbico resulta em aumento significativo das atividades de permeabilização de vesículas e hemolítica. Pathak et al. (1985) sugeriram que anfipaticidade seria mais importante que hidrofobicidade ou teor helicoidal para a atividade antimicrobiana. Entretanto, Dathe et al. (2002) trabalhando com peptídeos modelo do tipo KLA, projetados para que cada um de seus parâmetros físico-químicos variasse isoladamente, afetando minimamente os demais, mostrou que o aumento do momento hidrofóbico parece ter apenas efeitos restritos na eficiência de permeabilização de vesículas aniônicas; porém, em bicamadas zwitteriônicas, onde as interações eletrostáticas peptídeo-lipídeo são minimizadas, momentos hidrofóbicos maiores resultam em aumento significativo da atividade de permeabilização.

2.3.2.6 Hidrofobicidade média. É a medida da afinidade de um peptídeo pela região das cadeias acílicas dos fosfolipídeos de uma membrana, calculada como a média aritmética das hidrofobicidades dos resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica, segundo a escala de consenso de hidrofobicidades

proposta por Eisenberg et al. (1984). Em meio aquoso, as regiões hidrofóbicas das cadeias peptídicas não fazem ligações de hidrogênio com a água; isso cria regiões de volume excluído onde a ausência de água permite a atração entre grupos apolares, originando interações hidrofóbicas (Lum et al., 1999). Deber e Li (1995) encontraram que o teor helicoidal de um peptídeo em ambientes que mimetizam aquele das membranas é diretamente proporcional à hidrofobicidade; eles mostraram que resíduos alifáticos grandes como Ile e Val estabilizam a conformação helicoidal através de interações hidrofóbicas favoráveis entre as cadeias laterais. A hidrofobicidade é necessária para a efetiva permeabilização da membrana, entretanto, níveis elevados favorecem tanto as interações com vesículas zwitteriônicas como com as aniônicas, afetando a seletividade em membranas bacterianas (Wieprecht et al., 1997a; Tossi et al., 2000; Yeaman & Yount, 2003). Blondelle e Houghten (1992) estabeleceram boas correlações entre diminuição da hidrofobicidade e aumento da atividade antimicrobiana, e entre diminuição da hidrofobicidade e diminuição da atividade hemolítica, trabalhando com peptídeos projetados. Wieprecht et al. (1997a) investigaram o efeito de se variar a hidrofobicidade de análogos de magainina em relação a conseqüências para a ligação a membranas e permeabilização de vesículas; em vesículas 100% PG, níveis médios de hidrofobicidade não afetam a ligação e permeabilização porém, níveis mais altos de hidrofobicidade aumentam fortemente tanto a afinidade do peptídeo como a permeabilização de vesículas feitas de PC e PG, na razão 3:1.

A hidrofobicidade mostrou ser um importante fator modulador da atividade antibacteriana, pois em níveis muito baixos pode abolir essa atividade, em níveis altos acarreta aumento da atividade hemolítica, em níveis extremamente altos pode causar agregação e precipitação e ainda, em níveis intermediários torna mais eficientes as variações do momento hidrofóbico e aumenta a especificidade para bactérias Gram-positivas (Dathe et al., 1997, 1999).

2.3.2.7 Ângulo polar. É uma avaliação da extensão da face hidrofílica em relação à face hidrofóbica de um peptídeo quanto ele assume a conformação anfipática helicoidal. Entre os PAMs de várias fontes, o ângulo polar foi estimado como variando entre 160 e 220°, de acordo com suas projeções helicoidais no plano perpendicular ao eixo da hélice (Giangaspero et al., 2001; Tossi et al., 2000). Wieprecht et al. (1997b) mostrou que aumentando o ângulo polar, aumenta a afinidade de ligação, mas diminui a eficiência de permeabilização de análogos de magainina em vesículas PG. Em vesículas PCPG (3:1) e PC a eficiência de permeabilização aumenta com o ângulo polar e também aumentam as atividades antibacteriana e hemolítica. A mesma tendência foi estabelecida por Kiyota et al. (1996), trabalhando com peptídeos modelo Leu/Lys em bicamadas PC e eritrócitos humanos, embora nesses experimentos a carga não foi mantida constante entre os análogos estudados. Além disso, através de medidas de fluorescência de um único resíduo de Trp, na ausência e na presença de cloreto de guanidina (um desnaturante), eles mostraram que em vesículas aniônicas (PCPG 3:1), peptídeos com menor face polar penetram profundamente com suas regiões hidrofóbicas no centro da bicamada, e os peptídeos com maior face hidrofílica interagem superficialmente com a região lipídica

central ou apenas com a região das cabeças polares dos lipídeos aniônicos, próxima à superfície, resultando na não formação de canais ou poros (Kitamura et al., 1999). Blondelle e Houghten (1992) mostraram que uma face hidrofóbica limitada de 5 resíduos contíguos permitiu a um peptídeo modelo interagir com os lipídeos da parede celular de bactérias apresentando maior atividade antimicrobiana que um outro análogo com uma face hidrofóbica maior. Dathe et al. (2002), usando peptídeos modelo do tipo KLA e vesículas, distinguiu duas classes de análogos: aqueles com ângulo polar menor, que mostraram alta afinidade, mas moderada eficiência de permeabilização de bicamadas e outros análogos com ângulos polares $\geq 140^\circ$, que apresentam menor afinidade e muito mais eficiência de permeabilização. A reduzida eficiência de permeabilização de membranas por peptídeos com ângulos polares maiores foi atribuída à menor probabilidade de formação de poros ou sua maior instabilidade, resultante de repulsão eletrostática entre hélices próximas (Wieprecht et al., 1997b; Dathe et al., 2002; Dathe & Wieprecht, 1999).

2.4 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos

A mesma seqüência de passos parece caracterizar o mecanismo de ação dos PAMs catiônicos, independente de sua fonte, composição ou conformação, resumidamente ilustrada na Figura 2. Eles iniciam a interação como consequência da sua cationicidade inerente e do potencial transmembranar (internamente negativo), também inerente às células alvo. A atração eletrostática e a partição hidrofóbica freqüentemente agem em conjunto para promover as associações entre lipídeos e peptídeos (Deber & Li, 1995). Na superfície das membranas, as interações eletrostáticas de relativamente longo alcance são as primeiras a serem estabelecidas entre resíduos de aminoácidos catiônicos, como Lys e Arg, e os grupos fosfato negativamente carregados da membrana celular alvo, mas as interações hidrofóbicas são responsáveis pela incorporação na fase lipídica (Ito et al., 1993). Em solução aquosa muitos peptídeos não apresentam estrutura ordenada; mas, com a ligação à membrana, estabelecem-se ligações de hidrogênio intramoleculares que promovem a mudança conformacional.

A concentração de peptídeo na superfície da membrana aumenta à medida que outras moléculas de peptídeo são atraídas, ligam-se e enovelam-se, até alcançar uma razão limite entre as concentrações de peptídeo e lipídeo (P/L), isto é, o nível de peptídeos acumulados necessário para provocar sua imersão na bicamada lipídica (Ludtke et al., 1994; Huang, 2000). Peptídeos com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos bem definidos podem orientar-se uns em relação aos outros ou em relação a domínios semelhantes na membrana, influenciando a concentração limite P/L. Da mesma forma, a composição fosfolipídica da membrana, sua fluidez, tamanho e carga da cabeça polar, e o potencial transmembranar negativo influenciarão a orientação do peptídeo (paralela ou normal) em relação à superfície da membrana e a profundidade de inserção no centro da bicamada (Matsuzaki et al., 1994).

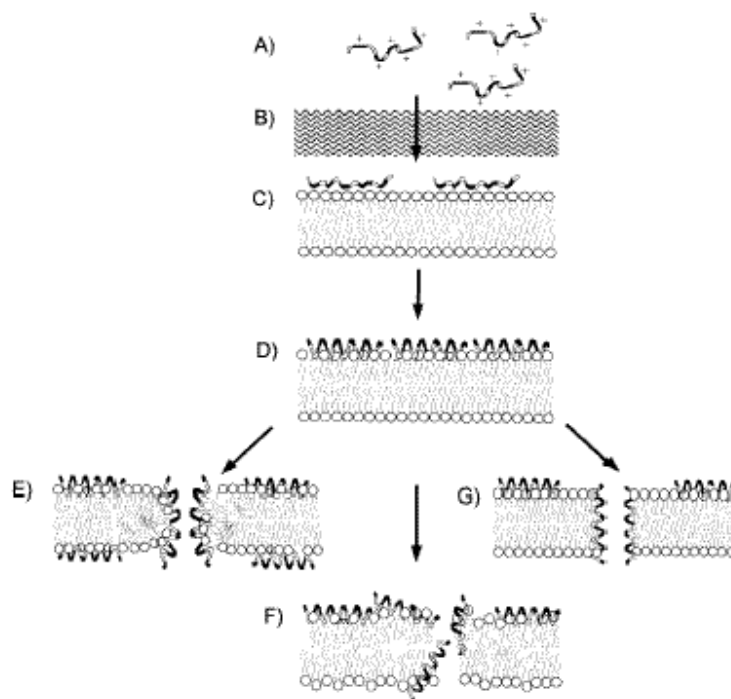


Figura 2: Representação esquemática dos modelos propostos para o mecanismo de ação dos PAMs helicoidais (Tossi et al., 2000). (A) Atração eletrostática à superfície aniônica dos microrganismos. (B) Passagem através da membrana externa e/ou da camada de peptidoglicanos. (C) Atração eletrostática aos fosfolípidios aniônicos da membrana citoplasmática, (D) Transição conformacional, inserção e acumulação na membrana. (E) Formação do poro toroidal e translocação do peptídeo. (F) Mecanismo carpete de permeabilização de membrana. (G) Formação do poro barril.

Em princípio, se a permeabilização de uma membrana é esperada, o comprimento do peptídeo na sua forma helicoidal deveria ser compatível com a espessura da mesma, que no caso de membrana bacteriana é da ordem de 30 Å. Alguns PAMs, como cecropinas (Andreu et al., 1992) e gramicidinas (Killian, 1992) são conhecidos por sua conformação helicoidal ser suficientemente longa e flexível para atravessar as bicamadas; entretanto, outros PAMs de cadeias curtas, com 10 a 15 resíduos, são claramente mais curtos e indicam a existência de outros mecanismos para superar a diferença de comprimento. Alguns autores (Siligardi & Drake, 1995; Andreu et al., 1992) consideram a possibilidade de que peptídeos com dobras na estrutura poderiam alongar-se, ou outros poderiam adotar conformações do tipo hélice 3_{10} ou P_{II} , que são estruturas helicoidais mais longas que a hélice- α ; outros autores (Killian, 1992) consideraram que os lipídeos poderiam adaptar-se por um efeito de afundamento da membrana. Mais recentemente mostrou-se que em concentrações de peptídeo abaixo da concentração limite necessária para a lise, ocorre uma redução da espessura da membrana, que seria provavelmente proporcional à concentração de peptídeo e que foi denominada de efeito de afinamento da membrana (Ludtke et al., 1995; Wu et al., 1995; Heller et al., 2000; Chen et al., 2002 e 2003). Esse afinamento é resultado de um aumento na área da membrana que se determinou ser da

mesma ordem do tamanho molecular do peptídeo (Wu et al., 1995; Ludtke et al., 1995; Heller et al., 2000).

Esses achados levaram à concepção do modelo de poro toroidal (ou *wormhole mechanism*). Peptídeos helicoidais ligados com seus eixos paralelos à superfície da bicamada causarão uma expansão lateral na região das cabeças das moléculas de fosfolípídeos. Como o volume total das cadeias é constante, isto fará com que a membrana se torne mais fina no local da ligação. O acúmulo de moléculas de peptídeo induz um afinamento da membrana, enquanto a energia de inserção não supere a soma da energia de ligação mais a energia de compressão (Ludtke et al., 1995) ou a tensão superficial (Huang et al., 2004). Acima da concentração limite para lise, os peptídeos inativos, paralelamente ligados à superfície, mudarão para um estado ativo, de inserção através da membrana, devido ao excessivo custo energético de deformação da membrana (Heller et al., 2000). Mostrou-se também que acima desta concentração limite, a membrana recupera sua espessura original, e o pareamento hidrofóbico entre o peptídeo e o lipídeo muda, possivelmente devido à formação de um poro através da membrana ou um poro toroidal (Figura 3b). Neste tipo de poro, a bicamada se dobrará e as moléculas de peptídeo revestirão sua superfície interna, empacotadas juntamente com as cadeias lipídicas (Heller et al., 2000); uma importante restrição deste modelo é que nele o peptídeo deve estar sempre associado às cabeças dos fosfolípídeos e nunca com a região das cadeias acílicas (Huang, 2000). A concentração limite de peptídeo apresentou-se dependente também da composição da bicamada. Apenas no estado inserido do peptídeo é que múltiplos poros foram identificados (Huang, 2000).

Brochard-Wyart e colaboradores (Puech et al., 2004; Brochard-Wyart et al., 2000) estudaram a formação de poros espontâneos induzidos por estresse em vesículas gigantes, procurando entender as contribuições da tensão superficial e da tensão de linha. Resumidamente, um poro é o resultado de um excesso de tensão superficial na membrana, que pode ser criada tanto por forte iluminação, como por eletroporação ou adição de surfactantes. Poros transientes se abrem devido a um excesso de tensão superficial em relação à tensão de linha e se fecham quando esta supera a primeira. Esses conceitos desenvolvidos para o caso da formação de poro sob estresse luminoso foram estendidos para a análise do mecanismo da formação de poros pelos PAMs por Huang et al. (2004); a tensão superficial é criada pela área adicional ocupada pelos peptídeos ligados na região das cabeças polares da camada externa; o efeito de afinamento da membrana foi atribuído à sobreposição das áreas deformadas causada pela ligação de várias moléculas de peptídeos, um efeito de múltiplas moléculas (Lee et al., 2005); a inserção de peptídeos (paralelamente ao plano normal em relação à superfície da membrana), a abertura do poro e o vazamento do conteúdo da vesícula reduzem a tensão superficial. A tensão de linha pode assim superar a tensão superficial reduzida e fechar o poro. A concentração limite para a formação do poro está correlacionada à curvatura espontânea dos lipídeos (Lee et al., 2005) e ao módulo de compressibilidade (Allende et al., 2005).

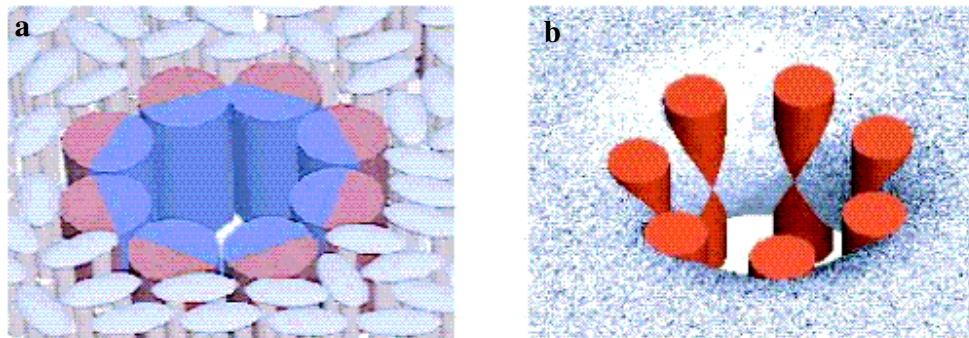


Figura 3: Modelos de poro (a) barril e (b) toroidal de acordo com Huang, 2000.

- (a) Monômeros de alameticina são representados por cilindros com $\sim 11\text{\AA}$ de diâmetro; azul e rosa representam respectivamente as faces hidrofílica e hidrofóbica do peptídeo. O diâmetro do poro é de $\sim 18\text{\AA}$. A molécula de lipídeo está representada por uma cabeça oval e duas caudas.
- (b) Monômeros de magainina estão representados por cilindros vermelhos embebidos na região das cabeças dos fosfolipídeos, representada pela superfície azulada. Esta se dobra continuamente de cima para baixo. O diâmetro do poro é de $\sim 30\text{\AA}$.

Experimentos realizados por Matsuzaki e seu grupo (1994, 1995b, 1996b, 1997b, 1998a e b) focalizaram principalmente as etapas subseqüentes à formação do poro. Com o fechamento do poro alguns peptídeos são transferidos para a camada interna da membrana, por um mecanismo denominado translocação. Dessa forma, as camadas internas e externas tornam-se contínuas e as moléculas de lipídeo podem mover-se entre ambos lados em um rápido "flip-flop", pois a estrutura do poro é bastante instável. Este mecanismo redistribui as moléculas de peptídeo entre as camadas, e a velocidade de formação de poro é reduzida, desativando o processo. O poro foi redefinido como uma perturbação estrutural ou defeito no empacotamento lipídico, que é devido a formação de um "complexo supramolecular peptídeo-lipídeo". Este mecanismo foi proposto para os peptídeos magainina, melitina e mastoparano X, em vesículas aniônicas (Matsuzaki et al., 1996b e a; 1997b) e posteriormente estendido aos peptídeos temporin B e temporin L (Zhao et al., 2002).

A formação de poro ou canal através da membrana também pode ser descrita por outro mecanismo, denominado "barril" ou feixe de hélices (Figura 3a). A principal característica deste tipo de poro é que nele, peptídeos helicoidais revestem completamente a superfície interna do poro, com suas superfícies hidrofóbicas interagindo diretamente entre si e com as cadeias acílicas dos fosfolipídeos, e suas superfícies hidrofílicas voltadas para o canal aberto. Alameticina e gramicidina são os peptídeos estudados que formam este tipo de poro. Eles possuem pequena carga catiônica, o que contribui para a estabilidade do poro, e alta hidrofobicidade, favorecendo interações tanto com bicamadas zwitteriônicas, como com aniônicas. Este mecanismo não exclui o anterior, onde um acúmulo de peptídeos, inicialmente ligados paralelamente ao plano da membrana é necessário para

que ocorra a inserção, após atingir a concentração limite. As diferenças são a forma como os peptídeos interagem uns com os outros, inserindo-se pelo menos como dímeros, e a forma como interagem com o centro lipídico da bicamada, e revestem o poro aberto (Oren & Shai, 1998; Bechinger, 1999; Huang, 2000).

Ainda um outro mecanismo, denominado poro transiente, foi desenvolvido quase paralelamente ao mecanismo do poro toroidal; eles diferem pelo fato de que neste a ocorrência de poros é eventual e a inserção dos peptídeos, que inicialmente estão ligados paralelamente à superfície da bicamada, romperá sua curvatura, conduzindo à micelização da membrana (Oren & Shai, 1998). Essa forma de desintegrar a membrana foi associada a efeitos semelhantes aos de um detergente, porque solutos contidos internamente são liberados independentemente de seu tamanho (Ladokhin & White, 2001; Bechinger, 1999).

É preciso salientar que esses modelos foram construídos sobre evidências indiretas da formação do poro, baseados na semelhança entre o padrão de difração de nêutrons obtido para gramicidina e aqueles obtidos para alameticina e magainina, onde água deuterada foi usada para dar o contraste necessário à observação dos poros. E, ainda, estes só puderam ser observados nas condições em que os peptídeos encontravam-se no estado ativo, ou seja, perpendicularmente ao plano da bicamada. De uma forma geral os poros já detectados por este meio apresentam diâmetro de no mínimo 20 Å, e foram observados em concentrações equivalentes à metade do necessário para eliminar 50% das bactérias, conforme ensaios de ação antibacteriana (Huang, 2000).

2.5 Potencial de uso terapêutico

Dentre os obstáculos naturais à ação dos PAMs estão a inativação causada pelo plasma e seus componentes e pelas barreiras de oligossacarídeos como a camada de peptidoglicanos nas bactérias, a matriz extracelular das células de eucariotos, ou os oligossacarídeos aniônicos como a heparina; há ainda a inativação pelos LPS das bactérias Gram-negativas, a proteólise do peptídeo e o baixo teor de fosfolipídeos aniônicos de algumas bactérias (Andreu & Rivas, 1998). O principal argumento a favor das pequenas chances de uma bactéria desenvolver resistência aos PAMs é seu alvo principal, a membrana celular. Um microorganismo teria de mudar significativamente a composição e/ou a organização de seus lipídeos para desenvolver resistência. Uma outra possibilidade seria a destruição do PAM por uma protease microbiana; isso requereria a destruição seletiva do PAM e não dos constituintes protéicos da célula (Zasloff, 2000). Ainda de acordo com esse autor (2002), as cepas mais virulentas de bactérias com que nos deparamos atualmente podem representar a forma de resistência que a maioria dos microrganismos podem desenvolver a um custo viável.

A pele é a primeira barreira a proteger os seres vivos de um ambiente ofensivo, e muitos PAMs foram nela encontrados. Assim o maior progresso na área provém do desenvolvimento de agentes de uso tópico, devido à relativa segurança desse tipo de terapia em comparação com a administração sistêmica de novas drogas de uso prolongado (Zasloff, 2002). PAMs podem ser

administrados via contato com mucosas para promover respostas do sistema imune como nas vacinas, em profilaxia ou em terapia (Brogden et al., 2003). Lazarev et al. (2004) mostraram que através da administração por aerosol de um vetor plasmídico expressando os genes de um PAM, pode-se realizar prevenção e tratamento de infecções por mycoplasma em granjas avícolas, evitando-se os efeitos colaterais da exposição sistêmica e controlando a ação citotóxica (Lazarev et al., 2004).

Outros campos promissores para aplicação dos PAMs são as infecções buco-dentais, onde as defesas naturais estão baseadas em peptídeos da saliva ricos em Histidina, as infecções oculares, e em agentes espermicidas, combinando atividades antibiótica e contraceptiva. Formas alternativas de terapia poderão surgir do fato que os PAMs aumentam ou reconstituem a potência de antibióticos atuais em vivo (Yeaman & Yount, 2003; Zasloff, 2002), ou baseadas na habilidade dos PAMs em ativar PAMs endógenos e ainda considerando seu potencial de ação sinérgica (Yeaman & Yount, 2003; Hancock & Diamond, 2000; Scott et al., 1999; Zasloff, 2002).

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é estudar o mecanismo da atividade de peptídeos antimicrobianos, extraídos de vespas, cujas cadeias são relativamente curtas (10 a 15 resíduos), e sua seletividade, em membranas modelo, baseado no interesse do emprego dessas substâncias como sucedâneos ou coadjuvantes na antibioticoterapia.

Os principais objetivos são:

1. Investigar a atividade lítica e a seletividade dos peptídeos EMP-AF, Eumenitin, Eumenes micado, Polybia MP1, Anoplin e Decoralin e de seus análogos em membranas modelo de diferentes composições.
2. Investigar as mudanças conformacionais provocadas por diferentes tipos de ambientes nesses peptídeos.
3. Estabelecer correlações entre as características estruturais, os dados de atividade biológica, a atividade lítica e os modelos mais aceitos para explicar seu mecanismo de ação.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Materiais

Peptídeos sintéticos: EMP-AF, EMP-AF1, EMP-AF2, EMP-AF3, Anoplin, Anoplin-OH, Eumenitin, Decoralin e Decoralin-OH, Eumenes micado -EM1, -EM2, -EM3 e -EM4 foram gentilmente fornecidos pelo Dr. K. Konno, Instituto Butantan, São Paulo, com grau de pureza acima de 95%, determinado por HPLC e MALDI-MS.

Polybia Paulista MP1, gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. M. S. Palma, IB – UNESP, Rio Claro, SP, com grau de pureza acima de 95% .

Lipídeos: L- α -Fosfatidilcolina (PC) ou L- α -lecitina, PM=760,09, obtida a partir da gema de ovo; L- α -Fosfatidil-DL-glicerol (PG), PM=771, obtido a partir da lecitina de gema de ovo, cardiolipina ou difosfatidilglicerol, (CL) de coração de boi foram adquiridos da Sigma, e usados diretamente. As concentrações dos fosfolipídeos presentes nas preparações de vesículas foram determinadas pela análise de fósforo segundo o método de Rouser et al. (1970) no laboratório da Prof. Iolanda Cuccovia, no IQUSP, São Paulo.

Outros: carboxifluoresceína (CF) 99% de pureza e tampão Tris (tris(hidroximetil)amino-metano) adquiridos da Sigma, assim como os componentes do tampão PBC 1 mM, preparado a partir de ácido bórico, citrato de sódio di-hidratado, e fosfato de potássio monobásico, anidro; dodecilsulfato de sódio (SDS) e colunas Sephadex G 25 M, PD-10 adquiridas da Amersham Pharmacia; clorofórmio, Na₂EDTA, fluoreto de Sódio (NaF), trifluoroetanol (TFE), Triton X-100, adquiridos da Merck. Demais reagentes comuns de laboratório foram adquiridos com qualidade p.a. ou grau espectrofotométrico. Foi utilizada apenas água milli-Q ou deionizada e duplamente destilada em equipamento de vidro com condutividade 3 μ S.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação de vesículas

Quantidades necessárias à obtenção de 1 mL de vesículas, na concentração inicial de 10 mM em fosfolipídeos totais, foram depositadas a partir de uma solução em clorofórmio, como filmes finos sobre as paredes de tubos de vidro de fundo arredondado, evaporando o solvente sob fluxo de N₂. O filme resultante foi então totalmente seco sob vácuo, durante três horas, no mínimo. Este filme consiste de bicamadas empilhadas. Vesículas multilamelares (MLVs) são produzidas a partir de tais filmes pela adição de tampão. A seguir os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e 30 s, para promover o descolamento das bicamadas das paredes do tubo, as quais devem ficar totalmente limpas;

a dispersão em meio aquoso e a agitação devem ocorrer em temperatura acima da T_C , o que no caso dos fosfolipídeos usados pode ser feito em temperatura ambiente.

4.2.1.1 Preparação de vesículas unilamelares, pequenas (SUVs)

Nos experimentos de difração circular (CD), o tampão utilizado foi 1 mL de Tris/ H_3BO_3 5 mM contendo 0,5 mM de Na_2EDTA , pH 7,5 ou igual volume de tampão PBC 1 mM, no mesmo pH, para obtenção das vesículas. Após agitação em vórtex, como descrito acima, a suspensão foi submetida à agitação em sonicador de ponta de titânio (Sonicador Virsonic 475, Virtis Co., Inc., NY) por 50 minutos, na potência 2, em banho de água e gelo e sob fluxo de N_2 , para evitar o aquecimento e a oxidação dos fosfolipídeos. Para remover restos de titânio a suspensão foi centrifugada a 14000 rpm em centrífuga de bancada (Eppendorf Centrifuge 5417C), durante 6 minutos. O sobrenadante dessa suspensão, de aspecto quase transparente e com brilho azulado, foi mantido sob refrigeração e usado dentro de um período de no máximo 24 h.

Foram preparadas vesículas zwitteriônicas, contendo 100% PC (PC), e aniônicas, contendo 70% PC e 30% PG, mol/mol (PCPG 7030).

4.2.1.2 Preparação de vesículas unilamelares, grandes (LUVs)

O procedimento inicial de preparação de filmes de fosfolipídeos é o mesmo que o descrito no item 4.2.1. A suspensão de LUVs foi obtida pela adição de 0.75 mL de solução do corante fluorescente Carboxifluoresceína 0,025M, em tampão Tris/HCl 10 mM contendo 1 mM de Na_2EDTA , e pH ajustado em 7,5 para os experimentos de liberação de conteúdo de vesículas. A seguir a suspensão foi igualmente agitada em vórtex por 2 min e 30 s e depois submetida à agitação em sonicador de ponta de titânio por 5 minutos, na potência 2, em banho de água e gelo. Após a centrifugação, como indicado em 4.2.1.1, a fração sobrenadante foi submetida à extrusão (equipamento Avanti Mini-Extruder), através de membrana dupla de policarbonato de 0,2 μm (Nuclepore Track-etch Membrane, Whatman Nuclepore, PCMB 19 mm 0,2 μm) num total de 11 extrusões lentas. Após descanso de uma hora, a suspensão foi submetida à filtração em gel em coluna Sephadex G 25 M, PD-10. Esta coluna foi previamente equilibrada com solução 0,15 M NaCl, em tampão Tris/HCl 10 mM, 1 mM Na_2EDTA e as vesículas foram eluídas com a mesma solução. A suspensão de aspecto levemente turbida e de cor alaranjado, sem brilho fluorescente, foi mantida sob refrigeração e usada dentro de um período de 72 horas.

Foram preparadas vesículas zwitteriônicas, contendo 100% PC (PC), e aniônicas, nas razões molares 70% PC e 30% PG (PCPG 7030), 40% PC e 60% PG (PCPG 4060), 70% PC e 30% CL (PCCL 7030), e 40% PC e 60% CL (PCCL 4060).

4.4.1.3 Análise da concentração de fosfolipídeos em vesículas

A concentração de fosfolipídeos ou lipídeos em vesículas foi determinada pela análise de fósforo baseada na metodologia proposta por Rouser et al. (1970). Uma alíquota da suspensão de vesículas, contendo aproximadamente 50 picomoles de P, foi transferida para um tubo de ensaio Pyrex™, longo, e seca em estufa em temperatura acima de 120°C. A seguir a amostra foi digerida durante 60 minutos em um bloco metálico de aquecimento a 180°C e na presença de 0,4 mL de ácido perclorórico concentrado p.a. A amostra depois de mineralizada e resfriada foi tratada com os seguintes reagentes, pela ordem: 1 mL de água desmineralizada ou milli-Q, 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25% p/v, e 0,4 mL de ácido ascórbico a 3% p/v, recém-preparado. Após cada adição o conteúdo do tubo é homogeneizado em vórtex e ao final levado a um banho-maria fervente por 5 minutos para desenvolvimento da cor azul característica. Um branco de reagentes e uma curva de calibração preparada com 5 alíquotas de uma solução padrão de KH₂PO₄ (PM 136,09) 1 mM, (conterá 1 nmol/μL) na faixa de 0 a 100 picomoles de P, são conduzidos paralelamente. Após resfriadas, as amostras e os padrões, até a temperatura ambiente, foram feitas as leituras de absorbância das amostra sem 797 nm, contra o branco de reagentes, usado como referência.

4.2.2 Medidas por dicroísmo circular (CD)

4.2.2.1 Condições

Espectros de CD foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 190 a 260 nm, usando um espectropolarímetro Jasco-710 (Tokyo, Japan), acoplado a um banho termostático Neslab RTE111. O instrumento é rotineiramente calibrado usando ácido d-10 canforsulfônico. Os espectros são obtidos a 25°C, usando-se cubetas de quartzo de 0.5 cm de caminho óptico, tomando-se a média de 4 a 6 espectros por determinação. Os parâmetros do instrumento foram fixados em: velocidade (scan speed) 20 nm/min, largura de banda (bandwidth) 1.0 nm, tempo de resposta (response) 0.5 s e 0.1 nm de resolução (resolution). Linhas de base são obtidas para cada sistema de solvente, tomando-se um espectro a mais, além daqueles necessários à medida da amostra em questão.

A elipticidade medida em cada determinação, θ (mdeg), é corrigida em função de diluição, quando for necessário, e da respectiva linha de base. Esses dados são, então, convertidos em elipticidade molar média por resíduo, $[\Theta]$ (deg cm²/dmol), pela relação:

$$[\Theta] \text{ (deg cm}^2\text{/dmol)} = 100\theta / (l c n), \quad 1$$

onde l é o caminho óptico em cm, c é a concentração em mM e n é o número de resíduos do peptídeo.

A fração helicoidal é determinada de acordo com o método proposto por Rohl e Baldwin (1998), assumindo um modelo de dois estados, isto é, o peptídeo apenas existe em dois estados, hélice

ou coil, e tomando-se a elipticidade molar observada em 222 nm, $[\Theta]_{222}^{\text{obs}}$, usando a seguinte equação:

$$f_H = \frac{[\Theta]_{222}^{\text{obs}} - [\Theta]_{222}^{\text{C}}}{[\Theta]_{222}^{\text{H}} - [\Theta]_{222}^{\text{C}}} \quad 2$$

onde $[\Theta]_{222}^{\text{C}}$ é a elipticidade molar para o peptídeo em random coil, corrigida para sua dependência com a temperatura, T (em °C) pela relação:

$$[\Theta]_{222}^{\text{C}} = 640 - 45 T \quad 3$$

e $[\Theta]_{222}^{\text{H}}$ é a elipticidade molar para a estrutura totalmente helicoidal, igualmente corrigida em função da temperatura, e em função da máxima elipticidade possível, sendo:

$$[\Theta]_{222}^{\text{H}} = (-42500 + 125 T) (1 - x / n) \quad 4$$

onde n é o número de resíduos na cadeia peptídica, e x é o número de grupos carbonila da cadeia peptídica que não estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio. Como os resíduos na primeira e na última volta da hélice não podem apresentar seus grupos NH e CO, respectivamente, ligados por pontes de hidrogênio ao restante da hélice, $x = 3$ para peptídeos com terminal C amidado e $x = 4$ para aqueles carboxilados, correspondendo ao número de carbonilas do peptídeo não ligadas numa hélice completa (Rohl & Baldwin, 1998).

4.2.2.2 Análise conformacional

A estrutura secundária assumida pelos peptídeos foi determinada em vários ambientes, em água, em tampão Tris/ H_3BO_3 5 mM, em TFE 40%, em solução de SDS a 165 μM , abaixo da concentração micelar crítica, (cmc), e acima desta a 8 mM, em suspensão de vesículas zwitteriônicas, PC, e aniônicas, PCPG 7030. Uma alíquota da solução estoque do peptídeo foi adicionada à cubeta e homogeneizada com a quantidade necessária do solvente para completar 1 mL. Os espectros foram obtidos e tratados conforme indicado anteriormente.

Todos os peptídeos deste estudo não apresentam estrutura ordenada em água e tampão, caracterizada por expressivo dicroísmo negativo ao redor de 200 nm. Em ambientes como os usados nestes experimentos todos os peptídeos apresentam espectros caracterizados por dois mínimos de absorção em 222 nm e 208 nm e um máximo em 190 nm.

4.2.2.3 Experimentos de titulação de peptídeos em vesículas

Alíquotas da suspensão de vesículas são adicionadas sucessivamente à uma solução do peptídeo em tampão. Este procedimento é repetido para no mínimo 3 diferentes concentrações de peptídeo. A associação com a bicamada lipídica é avaliada pela variação na elipticidade molar em 222 nm, em relação ao valor inicial ($[\Theta]_{222}^0$), antes da adição de vesículas. O sinal em 250 ou 260 nm foi tomado como referência para corrigir possíveis mudanças da linha de base e, ainda, um fator de correção empírico, obtido por Hellmann e Schwarz (1998), que depende da concentração de vesículas e do caminho óptico foi aplicado para evitar efeitos de espalhamento. A variação da elipticidade molar foi determinada na respectiva razão entre as concentrações de lipídeo e peptídeo. Desses dados construíram-se isotermas de associação e, pela relação de conservação de massa,

$$[\text{Pep}] = r [\text{Lip}] + c_f \quad 5$$

foram encontradas a razão entre as concentrações de peptídeo associado e de lipídeo (r), ou seja o grau de associação, e a concentração de peptídeo não associado (c_f), de acordo com o procedimento descrito por Schwarz e Blochmann (1993). A ligação entre peptídeos e vesículas é considerada inespecífica, no sentido de não haver um sítio de ligação específico e de ser dirigido principalmente por forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, também não específicas. Assim essa associação é tratada como um processo de partição. Essa ligação é na verdade o resultado de efeitos de solvatação do peptídeo pela vesícula, um grande agregado supramolecular. No equilíbrio, esse sistema é caracterizado termodinamicamente pela sua isoterma de associação, que implica diretamente na relação entre peptídeo ligado por quantidade de lipídeo e quantidade de ligante livre, que é avaliada de uma forma independente de modelos (Schwarz, 2000).

4.2.3 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria

4.2.3.1 Condições

Espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no fluorímetro Hitachi F4500 (Spectronic Inc., Rochester, NY), junto ao Departamento de Química do IBILCE, UNESP.

A supressão da fluorescência da carboxifluoresceína e sua liberação foram usados como marcadores do processo de permeabilização de vesículas. Espectros de emissão de fluorescência ao longo do tempo foram obtidos em 520 nm, com abertura de fenda de 2,5 nm, durante intervalos de interação variáveis, entre 15 e 30 minutos, dependendo da intensidade da interação. A amostra foi excitada em 490 nm, com abertura de fenda de 5,0 nm e tensão na fotomultiplicadora de 700 V. Em intervalos regulares o % de CF liberado é calculado como:

$$\% \text{ vazamento} = 100 \times (F - F_0) / (F_{100} - F_0)$$

6

onde F é a intensidade de fluorescência medida (em unidades arbitrárias), F_0 corresponde à intensidade de fluorescência das LUVs intactas e F_{100} é a intensidade de fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas.

As curvas que caracterizam a cinética de vazamento foram ajustadas usando o programa Origin 7.0 com a relação:

$$\% \text{ vazamento} = V_{\max} (1 - \exp(-t/\tau))$$

7

onde V_{\max} representa o vazamento máximo (no estado de equilíbrio), t é o tempo decorrido após a adição do peptídeo e τ (tau) é a constante de tempo em segundos. De acordo com Allende et al. (2005), V_{\max} está relacionado ao número de canais ou poros e sua condutância, e τ está relacionado à velocidade de formação desses canais ou poros. Romano-Fontes et al. (2000) demonstraram que τ , sendo o inverso da constante de velocidade de vazamento, é proporcional ao inverso do coeficiente de permeabilidade da membrana e é diretamente proporcional do raio da vesícula.

4.2.3.2 Medidas da atividade lítica dos peptídeos

Alíquotas da suspensão de vesículas são adicionadas sob agitação à cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, contendo a solução do peptídeo em estudo, em tampão Tris/HCl 10 mM, 1 mM Na₂EDTA e 0,15 M de NaCl, pH 7,5. Após o período de contato necessário para atingir uma intensidade de fluorescência estável, adicionam-se 20 µL do detergente Triton X-100 a 10%, para se obter a intensidade de fluorescência máxima da CF encapsulada. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Todos os peptídios estudados foram extraídos do veneno de vespas solitárias encontradas no Japão, exceto Polybia MP1 que provém do veneno de vespa social encontrada no Brasil. Todos são catiônicos, helicoidais, antimicrobianos e apresentam de 20 a 50% de resíduos polares ou carregados na estrutura. A Tabela 1 apresenta suas seqüências primárias e as de alguns outros peptídios, cujos dados da literatura foram usados como referência.

Tabela 1. Seqüência primária e Peso Molecular dos peptídios estudados; em azul, resíduos positivamente carregados; vermelho, negativamente carregados; verde, polares, sem carga.

Anoplin	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH ₂	1152
Anoplin-OH	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-OH	1138
Decoralin	Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-Thr-OH	1239
Decoralin-NH₂	Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-Thr-NH ₂	1254
EMP-AF	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH ₂	1521
EMP-AF 1	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-OH	1506
EMP-AF 2	Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH ₂	1181
EMP-AF 3	Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-OH	1166
EMP-EM1	Leu-Lys-Leu-Met-Gly-Ile-Val-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-NH ₂	1480
EMP-EM2	Leu-Lys-Leu-Leu-Gly-Ile-Val-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Ile-NH ₂	1462
EMP-EM3	Phe-Asp-Ile-Gly-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Val-Val-Ser-Gly-Leu-NH ₂	1499
EMP-EM4	Phe-Asp-Leu-Gly-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Val-Val-Ser-Gly-Leu-NH ₂	1499
Eumenitin	Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Ile-Phe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Leu-Leu-Thr-OH	1628
Polybia MP1	Ile-Asp-Trp-Lys-Lys-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH ₂	1652
MP*	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂	1477
MP-B*	Leu-Lys-Leu-Lys-Ser-Ile-Val-Ser-Trp-Ala-Lys-Lys-Val-Leu-NH ₂	1610
MP-X*	Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	1554
Melittin*	Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH ₂	
Magainin*	Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-COOH	

(*) peptídios cujos dados da literatura foram usados como referência.

5.1 EMP-AF

É um peptídeo da família dos mastoparanos, extraído do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*; apresenta atividade antimicrobiana, seletiva para bactérias Gram-positivas, hemolítica e de degranulação de mastócitos. EMP-AF, ou eumenine mastoparano-AF, é o principal peptídeo que compõe o veneno extraído da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*. Além do EMP-AF, outros três análogos, EMP-AF 1~3 foram isolados da mesma fonte, provavelmente devido à digestão enzimática ocorrida durante a estocagem e procedimentos de dissecação (Konno et al., 2000). Esses análogos não apresentam atividade hemolítica nem de degranulação de mastócitos; o análogo carboxilado apresenta atividade antimicrobiana bastante reduzida e os demais análogos de cadeia curta perdem a atividade antimicrobiana.

Análise conformacional por Dicroísmo Circular

Os espectros de CD de EMP-AF mostrados na Figura 4, em água e em tampão Tris/HCl são característicos de uma estrutura secundária desordenada que passa a ter características de uma estrutura em hélice- α em ambientes que mimetizam a anisotropia e a hidrofobicidade das membranas, como em micelas de SDS 8 mM, em contato com vesículas aniônicas, PCPG 7030, e em TFE a 40%, um solvente indutor de estruturas secundárias, por promover o fortalecimento das pontes de hidrogênio do peptídeo nesse meio (Luo & Baldwin, 1997). Em contato com vesículas zwitteriônicas o espectro obtido desvia-se ligeiramente do espectro característico de random coil, mas na condição deste experimento, também não é característico de uma estrutura helicoidal. Em SDS abaixo da cmc, o espectro sugere interação entre as cadeias peptídicas, pois suas características são indicativas de que nesse ambiente parte das moléculas assumem a estrutura em hélice- α , mas parte das moléculas assumem estruturas em folha- β ou dobras (turns). Em concentrações abaixo da cmc, a solução de SDS é reconhecida como indutora de estruturas em folha- β (Zhong & Johnson, 1992; Waterhous & Johnson, 1994; Blondelle et al., 1997); resíduos centrais da cadeia como Ala, Gly e Ser apresentam propensão para conformação em folhas- β nesse ambiente. Ainda segundo Blondelle et al. (1997), considera-se que essa conformação seja consequência de um alinhamento hidrofóbico entre os resíduos não polares do peptídeo e as cadeias alquílicas do SDS, estabilizadas pelas interações eletrostáticas dos resíduos positivamente carregados com os grupos sulfonato do SDS.

A Tabela 2 mostra os valores da fração de hélice- α (f_H) obtidos para EMP-AF e seus análogos, correlacionados aos valores de carga líquida (Q), hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μ). Esses resultados indicam que o teor de hélice- α depende do ambiente, do tipo de terminal-C, amidado ou carboxilado e do comprimento da cadeia peptídica. A propensão helicoidal dos resíduos que compõem essas cadeias aumenta em ambientes que mimetizam membranas, em relação à propensão helicoidal em água (Deber & Li, 1995; Blondelle et al., 1997; Rohl & Baldwin, 1998;). Assim, a maior propensão helicoidal dos resíduos observada nesses ambientes contribui para o aumento da fração helicoidal. A modificação do terminal-C, originalmente amidado para carboxilado, introduz uma carga negativa no polo

negativo do macrodipolo da hélice, desestabilizando a estrutura em todos os ambientes testados. Isto porque uma ponte de hidrogênio deixa de existir entre o grupo amida do terminal-C e a carbonila do resíduo Ile10 (Sforça et al., 2004). Um outro efeito importante a ser considerado nos análogos truncados EMP-AF2 e -AF3 é a presença de um resíduo positivamente carregado de Lys na posição 2, muito próximo do polo positivo do macrodipolo da hélice, que desfavorece a estabilidade da hélice- α (Creighton, 1993; Shoemaker et al., 1985).

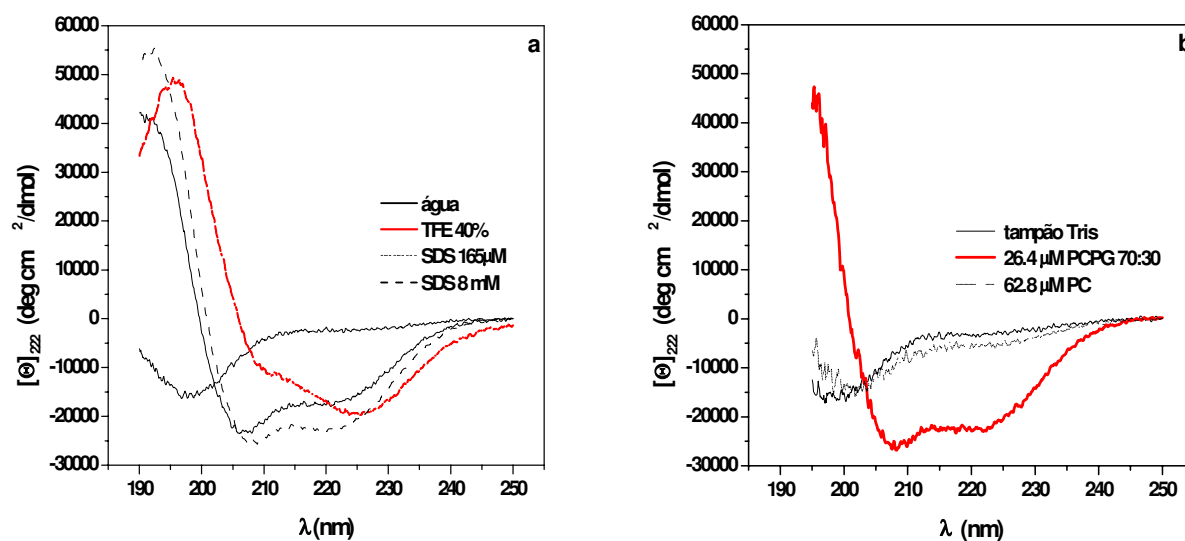


Figura 4: Espectros de CD de EMP-AF a 10 μM , 25°C : (a) em (—) água, (—) TFE 40%, (...) SDS 165 μM , (---) SDS 8 mM; (b) espectros na presença de (—) tampão, (...) vesículas PC e (—) vesículas PCPG 7030, respectivamente nas relações L/P de 6,3:1 e 2,6:1.

Tabela 2. Características estruturais de EMP-AF e seus análogos, inclusive fração de hélice- α , em diversos ambientes, a 10 μM .

	Q^1	H	μ	f_H			
				TFE ²	SDS ³	PCPG ⁴	PC ⁵
EMP-AF	+4	0,051	0,341	0,545	0,721	0,731	0,162
EMP-AF1	+3	0,051	0,341	0,222	0,293	0,278	rc
EMP-AF2	+4	0,009	0,423	0,143	0,097	0,136	rc
EMP-AF3	+3	0,009	0,423	0,131	0,097	rc	rc

¹ inclui uma carga adicional relativa ao terminal-C amidado; ² 40% TFE; ³ 8.0 mM SDS;

⁴ razão L/P = 2,6:1; ⁵ razão L/P = 6,3:1; rc = random coil.

A importância da interação eletrostática na estabilização da conformação helicoidal é revelada pela diferença observada na fração de hélice- α entre vesículas aniônicas e zwitteriônicas, como também foi observado para outros peptídeos catiônicos (Dathe et al., 2001; Blondelle et al., 1999). Porém, a fração de hélice- α aumenta significativamente em vesículas zwitteriônicas em função da concentração de lipídeo para o EMP-AF, atingindo cerca de 53%, numa relação L/P de 150:1, o que não acontece com o EMP-AF1, como mostra a Figura 5. Esse aumento na fração helicoidal aparentemente não pode ser atribuído a um processo de agregação, pois o teor helicoidal independe da concentração dos peptídeos (Waterhous & Johnson, 1994). A Figura 5 também indica que EMP-AF só se encontrará totalmente ligado em vesículas zwitteriônicas a partir da relação L/P de 60:1, (Dathe et al., 2001), enquanto em vesículas aniônicas a relação P/L é cerca de 20 vezes menor. Isso indica a menor afinidade de ligação de EMP-AF com vesículas zwitteriônicas do que com vesículas aniônicas, como já identificado para outros mastoparanos (Schwarz & Blochmann, 1993; Hellmann & Schwarz, 1998). O teor helicoidal de EMP-AF em vesículas PC na relação L/P de 150:1 é praticamente o mesmo encontrado em TFE 40%, sugerindo que nesse ambiente o efeito hidrofóbico é o responsável pela estabilidade conformacional (Blondelle et al., 1997).

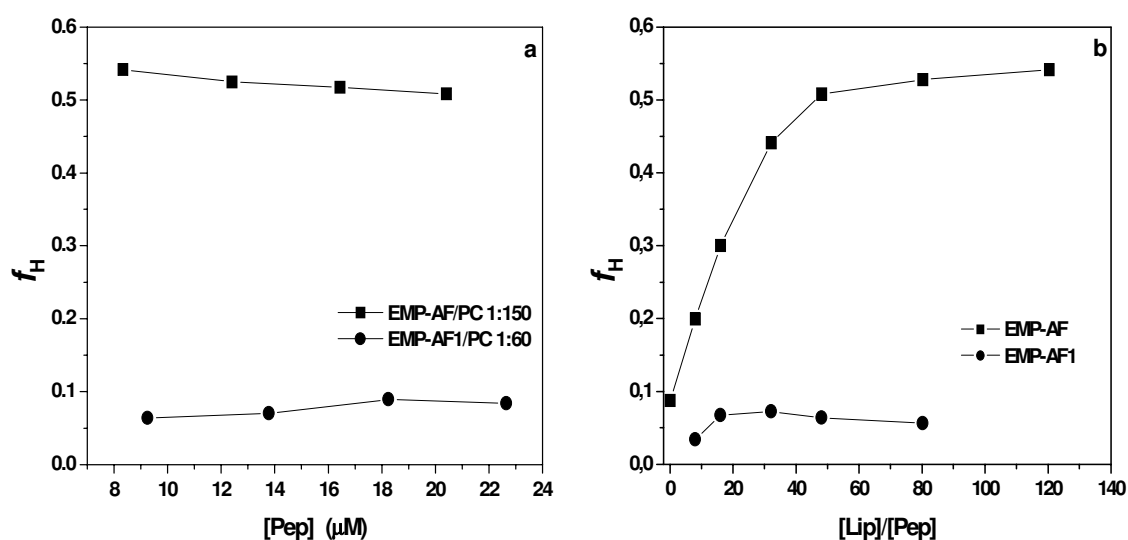


Figura 5: Dependência do teor de hélice- α (f_H), a 25°C, pH 7,5 com (a) concentração de peptídeo e com (b) a razão L/P em vesículas PC.

O terminal-C carboxilado de EMP-AF1 é responsável pela menor elipticidade desse peptídeo, segundo resultados de análise estrutural por RMN (Sforça et al., 2004). Além do efeito devido à mudança no macrodipolo da hélice, nesse análogo não existe a possibilidade de formação da ponte de hidrogênio entre a amida do terminal-C e a carbonila da Leu10, como acontece com EMP-AF. Porém, a ausência da

interação eletrostática entre EMP-AF1 e as cabeças zwitteriônicas das vesículas PC parece ser mais importante que o efeito do macrodipolo da hélice para o grau de elipticidade nesse ambiente.

Análise da atividade lítica

A Figura 6 ilustra o processo de lise em vesículas PC e PCPG 7030 por EMP-AF. Em 10 minutos de contato e numa relação L/P de 9:1, EMP-AF induziu liberação praticamente completa do conteúdo das vesículas PCPG 7030, enquanto menos de 50% do conteúdo das vesículas PC, foi liberado no mesmo intervalo de tempo, na razão 15:1. De uma forma geral, essas curvas exemplificam o perfil da cinética que encontramos para EMP-AF e os demais peptídeos deste estudo: em baixas concentrações de peptídeo, as curvas não são exponenciais, em concentrações intermediárias as curvas são mono-exponenciais, ajustadas pela equação 7, e em concentrações mais altas, são necessárias duas exponenciais para ajustá-las matematicamente ($\% \text{ vazamento} = V_{\max 1} (1 - \exp(-t/\tau_1)) + V_{\max 2} (1 - \exp(-t/\tau_2))$), embora esta forma não corresponda a um modelo físico já estudado. O ajuste foi considerado adequado quando o coeficiente de correlação é maior do que 97%. As curvas da cinética de vazamento em vesículas PC 15 μM (não mostrado) e PCPG 7030 10 μM (Figura 6) com EMP-AF são exemplos de processos em duas etapas, a fase inicial de liberação rápida, seguida de uma fase lenta, de liberação desacelerada, que se ajustam desta última forma. Para as concentrações de peptídeo de 3,75 e 5 μM em PCPG 7030 e 10 μM em PC o ajuste adequado é aquele dado pela equação 7.

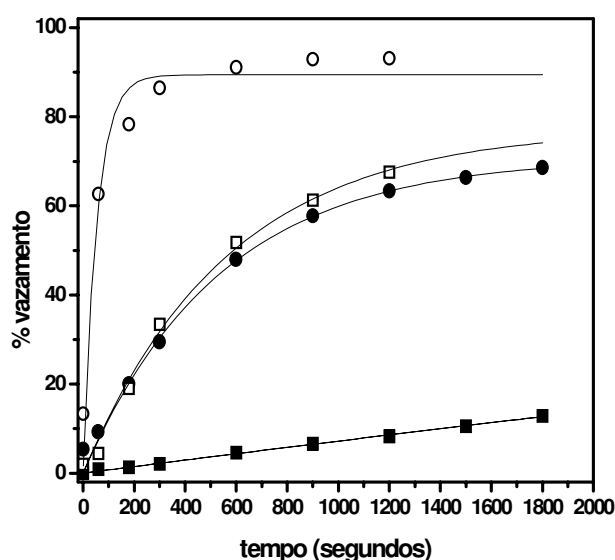


Figura 6: Cinética do vazamento de vesículas PC (150 μM) e PCPG 7030 (90 μM) causado pela interação com EMP-AF nas concentrações de (■) 3,75 μM e (●) 10 μM , para vesículas PC e (□) 3,75 μM e (○) 10 μM , para vesículas PCPG 7030.

A Tabela 3 mostra algumas constantes de vazamento máximo, V_{max} , e de tempo, τ , obtidas pelo ajuste das curvas de cinética com a equação 7 ou pela soma de duas exponenciais. Estas constantes são dependentes da relação P/L, no entanto as constantes de tempo mostraram-se mais sensíveis à essa relação P/L do que $\%V_{max}$.

Tabela 3: Constantes $\%V_{max}$ e τ obtidas para as cinéticas de interação de EMP-AF, a 25°C, em vesículas PCPG 7030 90 μ M e PC 150 μ M.

	[Pep] (μ M)	P/L	$\%V_{max1}$	$\%V_{max2}$	τ_1 (s)	τ_2 (s)
PC	10	0,0667	70,9	-	538	-
	15	0,1	66,3	34,7	116	3000
PCPG 7030	3,75	0,0417	70,4	-	926	-
	5	0,0556	73,9	-	467	-
	7,5	0,0833	55,0	42,0	91	856
	10	0,111	46,4	46,5	25	296

EMP-AF1 e os análogos de cadeia mais curta são muito menos eficientes em induzir o vazamento das vesículas aniônicas e zwitteriônicas nas mesmas condições de EMP-AF, conforme indica a Tabela 4. No caso de EMP-AF2 e EMP-AF3 isso pode ser atribuído ao menor comprimento da cadeia, à menor hidrofobicidade e à menor elipticidade, mas não ao tipo de terminal-C, já que ambos apresentam comportamentos semelhantes em ambos tipos de vesículas. Nesses peptídeos e também em EMP-AF1 a menor capacidade de liberação de conteúdo das vesículas parece estar diretamente ligada à menor elipticidade e às interferências com o macrodipolo da hélice geradas pela remoção do grupo amida do terminal-C em EMP-AF1 e, em EMP-AF2 e -AF3 pela proximidade da Lys2 ao terminal-N. A eficiência de permeabilização de vesículas tanto aniônicas quanto zwitteriônicas está diretamente relacionada à fração de hélice- α de EMP-AF e seus análogos nessas vesículas.

Tabela 4. % Vazamento (%V) de vesículas zwitteriônicas (PC) e aniônicas (PCPG 7030) induzido por EMP-AF e seus análogos, a 25°C, após diferentes tempos de contato (em segundos).

	$\%V_{300}$ PCPG 7030	$\%V_{300}$ PC	$\%V_{600}$ PCPG 7030	$\%V_{600}$ PC	$\%V_{1200}$ PCPG 7030	$\%V_{1200}$ PC
EMP-AF	0.86	0.29	0.87	0.48	0.93	0.63
EMP-AF1	0.042	0.014	0.052	<0.02	0.055	<0.03
EMP-AF2			<0.03	<0.01	<0.04	<0.02
EMP-AF3			<0.04	<0.01	<0.04	<0.02

A eficiência de permeabilização de vesículas por EMP-AF apresentou-se diretamente dependente do caráter iônico da bicamada lipídica, da mesma forma como encontrado em relação ao teor helicoidal. Mostrou-se, ainda, também dependente da relação L/P. Observou-se uma dependência sigmoideal da curva de dose-resposta (% vazamento) com a concentração de peptídeo, conforme mostra a Figura 7 para vesículas PC (a) e PCPG 7030 (b).

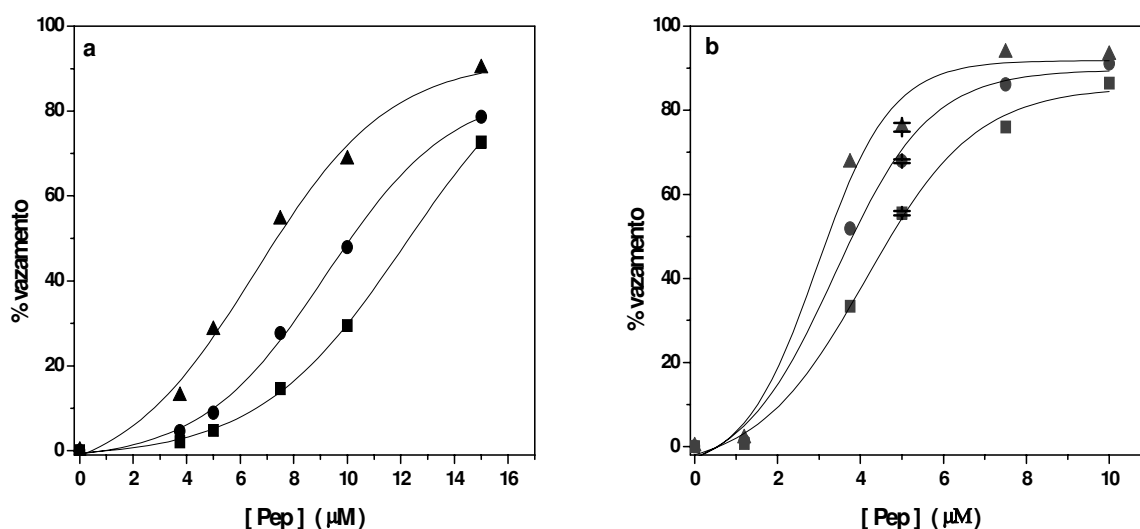


Figura 7: Curvas de dose-resposta para EMP-AF em (a) 150 μM PC e (b) 90 μM PCPG 7030, com tempos de contato de (■) 5, (●) 10 e (▲) 30 em (a) ou 20 minutos em (b). Desvio padrão $\leq 1,0\%$.

Esse tipo de dependência sigmoideal é característico de processos cooperativos e mostra a existência de uma concentração crítica de peptídeo necessária à indução de vazamento das vesículas. Comportamento semelhante foi observado para outros peptídeos que formam poros toroidais em vesículas PCPG 7030, como mastoparano X (Matsuzaki, 1996a) e, em vesículas zwitteriônicas, para melitina (Yang et al., 2001). Modelos desenvolvidos por Huang e Matsuzaki para o poro toroidal (Huang, 2000; Chen, 2003; Matsuzaki, 1999a) e por Shai para o mecanismo carpete ou detergente (Oren & Shai, 1998) para explicar o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos partem de um acúmulo de moléculas do peptídeo na superfície da membrana para início do processo lítico. A concentração crítica (CC) ou limite para induzir a lise das vesículas é da ordem de 5 μM em vesículas PC e de 2 μM em PCPG 7030; se todas as moléculas de peptídeo estivessem efetiva e uniformemente ligadas à superfície das vesículas, teríamos que a razão crítica L/P seria de 30 ou 45 moléculas de lipídeo por molécula de peptídeo, respectivamente. Esse pequeno acúmulo de moléculas de EMP-AF, suficiente para induzir poros que resultam em vazamento, sugere que a intensa acumulação descrita no mecanismo tipo “carpete” não seria necessária (Oren & Shai, 1998).

O processo cooperativo de vazamento de vesículas foi observado para o peptídeo com maior conteúdo helicoidal e essas características mostraram-se diretamente relacionadas à maior eficiência

antimicrobiana de EMP-AF em relação aos seus análogos. Também a ação hemolítica mostrou-se diretamente relacionada ao teor de hélice- α e à eficiência de permeabilização de vesículas zwitteriônicas de EMP-AF e seus análogos.

Os análogos truncados EMP-AF2 e EMP-AF3 têm sua hidrofobicidade significativamente reduzida como consequência da remoção dos três resíduos iniciais; isto pode contribuir para torná-los menos eficazes em interagir com membranas, mas não pode ser considerado determinante, pois outros peptídeos igualmente curtos, como Anoplin e Decoralin e que possuem hidrofobicidade ainda menor são bastante ativos.

5.2 Eumenitin

É um peptídeo da família dos mastoparanos, extraído do veneno da vespa solitária *Eumenes rubronotatus*; inibe a atividade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não apresenta atividade hemolítica em relação a eritrócitos humanos e estimula apenas moderadamente a desgranulação de mastócitos. Eumenitin é o principal componente extraído do saco venomial dessa espécie. Sua seqüência primária com 15 resíduos, um a mais do que EMP-AF e MP, apresenta alto grau de homologia com esses peptídeos porém, contrariamente a eles, eumenitin não possui o terminal-C amidado. Esses dados já foram publicados (vide Apêndice).

Análise conformacional por Dicroísmo Circular

Os espectros de CD de eumenitin em água, em tampão Tris/HCl, pH 7,5, e em contato com vesículas PC confirmam a ausência de estrutura secundária nesses ambientes (Figura 8). Como descrito para EMP-AF, em presença de TFE 40%, SDS 8 mM ou vesículas aniônicas de PCPG 7030 o peptídeo assume uma estrutura característica de hélice- α . A elipticidade em SDS acima da cmc e em vesículas aniônicas pode ser atribuída ao fato de que o ambiente lipofílico e anisotrópico das micelas e vesículas favorecem as ligações de hidrogênio intramoleculares; as interações hidrofóbicas dos resíduos apolares também são favorecidas e os resíduos carregados, como a Lys, não sofrerão repulsão entre si e poderão afundar suas cadeias laterais hidrofóbicas junto às caudas hidrofóbicas do SDS, (Blondelle et al., 1997). Em SDS abaixo da cmc, eumenitin apresenta um espectro que se desvia ligeiramente do espectro característico de uma hélice- α , podendo indicar uma pequena proporção de moléculas em estruturas diferentes desta, associadas ao SDS monomérico, ou uma pequena n-merização do peptídeo nesse ambiente, uma vez que a razão $[\Theta]_{222} / [\Theta]_{208}$ é maior que 1 (Blondelle et al., 1997).

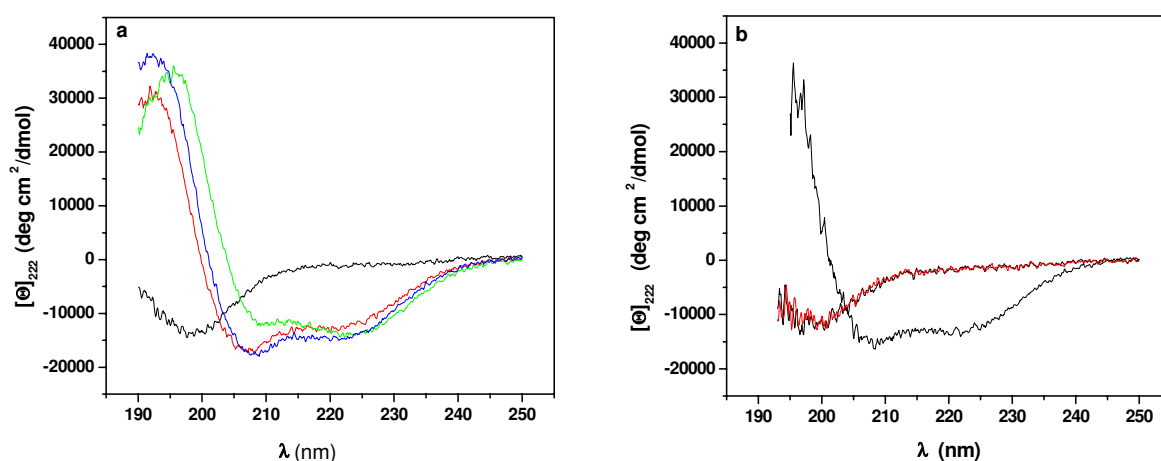


Figura 8: Espectros de CD de eumenitin a $8.5\mu\text{M}$, 25°C , em diferentes ambientes: (a) (—) água, (—) TFE 40%, (—) SDS $165\mu\text{M}$, (—) SDS 8 mM; (b) (—) tampão Tris pH 7,5, (—) vesículas PC e (—) vesículas PCPG 7030, respectivamente nas relações L/P de 6,3:1 e 2,6:1.

A Tabela 5 resume as características estruturais de eumenitin em comparação a EMP-AF, incluindo seu teor de hélice- α nos vários ambientes. O grau de elipticidade de eumenitin mostrou ser dependente da natureza iônica dos fosfolípídeos. No experimento de titulação de peptídeo com vesículas observamos que as zwitteriônicas induziram apenas um pequeno aumento no teor de hélice- α , mesmo em concentrações mais altas de peptídeo e de lipídeo; a Figura 9a mostra que esse pequeno teor independe da concentração de lipídeo e de peptídeo. Entretanto, vesículas aniônicas induziram expressivo teor helicoidal, da mesma ordem de grandeza que o observado em SDS acima da cmc, e a fração de hélice- α calculada é fortemente dependente da relação L/P até uma relação de 20:1, conforme indica a Figura 9a.

Tabela 5. Propriedades estruturais de Eumenitin (8.5 μM) em comparação a EMP-AF (10 μM), e suas respectivas frações de hélice- α (f_H) em diferentes ambientes.

	Q ¹	H	μ	f_H			
				TFE ²	SDS ³	PCPG ⁴	PC ⁵
Eumenitin	+3	0,002	0,265	0,43	0,50	0,45/0,72	0,07/0,11
EMP-AF	+4	0,051	0,342	0,545	0,721	0,731	0,162

¹ inclui uma carga adicional relativa ao terminal-C amidado; ² 40% TFE; ³ > 8.0 mM SDS;

⁴ razão L/P = 2,6:1 e 53:1; ⁵ razão L/P = 6,3:1 e 38:1

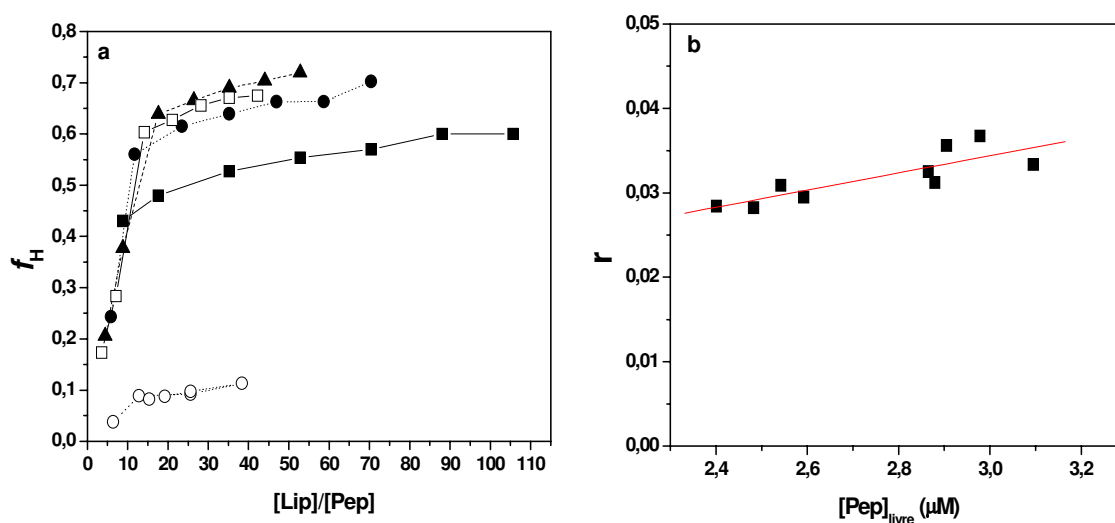


Figura 9: (a) Dependência do teor de hélice- α (f_H) com a razão L/P para eumenitin nas concentrações de (■) 10 μM , (●) 15 μM , (▲) 20 μM e (□) 25 μM em PCPG 7030, e (○) 10 μM em PC. (b) Constante de associação (r) ou razão entre as concentrações de peptídeo ligado e lipídeo total, PCPG 7030, em função da concentração de peptídeo livre, de acordo com a equação 5.

A partir das isotermas de ligação de eumenitin em vesículas PCPG 7030 determinamos os valores de r , a razão entre as concentrações de peptídeo associado às vesículas e de lipídeo total, e c_f , a concentração de peptídeo livre, que descrevem o equilíbrio de partição dessa interação (equação 5); a Figura 9b mostra a relação entre eles e indica que existe uma alta afinidade nessa ligação. Resultados de r e c_f bastante semelhantes a estes foram encontrados para mastoparano X em vesículas PC (Hellmann & Schwarz, 1998) e para magainina em vesículas fortemente anionicas PC/LPS 5050 (Matsuzaki, 1999b). Para mastoparano em vesículas PC o valor de r é cerca de 10 vezes menor (Schwarz & Blochmann, 1993). A razão entre r e c_f fornece o coeficiente de partição que é de $(1,16 \pm 0,05) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

A baixa hidrofobicidade de eumenitin certamente contribui para sua baixa afinidade em relação às vesículas PC, mas a forte interação com as membranas aniônicas tornam esse peptídeo altamente seletivo. Entretanto, o fato de sua cadeia possuir um resíduo a mais que EMP-AF parece não contribuir para seu teor helicoidal. Excepcionalmente entre os peptídeos de vespa solitária estudados, eumenitin, em sua forma nativa, não apresenta o terminal-C amidado. Assim, se compararmos o desempenho de eumenitin com EMP-AF1, ambos com terminal-C carboxilado, observaremos uma grande diferença, que provavelmente resulta das características da sua seqüência primária, mas principalmente de sua maior elipticidade.

Análise da atividade lítica

A atividade lítica de eumenitin em vesículas PCPG 7030 e em vesículas PC foi avaliada durante 30 minutos de contato, em diferentes concentrações do peptídeo. O ajuste das isotermas de vazamento mostrou que o processo é semelhante ao descrito para EMP-AF em vesículas aniônicas, ou seja, não-exponencial em baixas concentrações, exponencial, descrito pela equação 7 nas concentrações intermediárias e, nas concentrações acima de $1,25 \mu\text{M}$, passível de ajuste com uma soma de exponenciais. No entanto, em vesículas zwitteriônicas, o processo é significativamente mais lento e dependente de uma relação P/L cerca de 20 vezes maior (Tabela 6).

Tabela 6. Constantes $\% V_{\max}$ e τ obtidas para a cinética da interação do Eumenitin em vesículas PCPG 7030 e PC.

	[Pep] (μM)	P/L	$\% V_{\max}$	τ (s)
PCPG 7030	1,25	0,0379	93,0	275
PC	75	0,778	87,8	787

Os gráficos de vazamento em função da concentração de peptídeo (Figura 10) indicam que o processo de liberação do conteúdo de vesículas por eumenitin em vesículas PCPG 7030 é também

cooperativo. Porém, em vesículas zwitteriônicas parece não haver cooperatividade, provavelmente devido à baixa velocidade do processo.

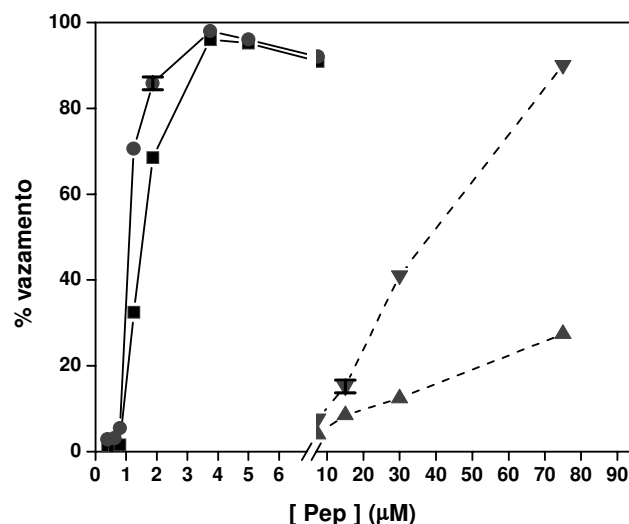


Figura 10: Curvas de dose-resposta para eumenitina em vesículas aniônicas (à esquerda, linhas contínuas) e em vesículas zwitteriônicas (à direita, linhas pontilhadas). O percentual de vazamento está apresentado para os tempos de contato de (■) 1 min. e (●) 3 min. em 60 μM PCPG (70:30), e (▼) 1 min. e (▲) 30 min em 100 μM PC. Desvio padrão $\leq 1,5\%$ calculado a partir de 5 repetições.

Em vesículas aniônicas eumenitina causou um vazamento de conteúdo de mais de 90% em um minuto, na concentração de 4 μM, mostrando uma eficiência de permeabilização significativamente maior do que a verificada com EMP-AF, que na mesma concentração atingiu apenas 30% em 5 minutos. A concentração limite necessária à indução do vazamento é menor que 1 μM, também inferior à encontrada para EMP-AF. Em vesículas PC foi necessária uma concentração pelo menos 10 vezes maior de eumenitina para induzir a liberação do conteúdo das vesículas, num processo bifásico, mas bem mais lento e de baixa cooperatividade. Essas observações assinalam a importância das membranas eletricamente negativas para a seletividade de eumenitina.

O baixo teor helicoidal e a pequena eficiência de permeabilização de vesículas zwitteriônicas estão diretamente correlacionados à baixa atividade hemolítica de eumenitina, assim como o expressivo teor de hélice- α e a eficiente permeabilização de vesículas aniônicas correlacionam-se à atividade antimicrobiana desse peptídeo. Semelhantemente a EMP-AF em vesículas aniônicas, o processo lítico é cooperativo e, da mesma forma, o mecanismo de formação de poro descrito como tipo “carpete” (Shai, 1999) parece não se aplicar ao caso de eumenitina, já que a indução de vazamento acontece em concentrações bastante baixas, da ordem de 50 moléculas de lipídeo por molécula de peptídeo.

5.3 EMP-EM1~4

Esta série de peptídeos (EMP-EM1, EMP-EM2, EMP-EM3 e EMP-EM4) da família dos mastoparanos foi extraída do saco venomial da vespa solitária *Eumenes micado*, onde os quatro análogos ocorrem simultaneamente. Isso sugere uma possível sinergia entre eles. Semelhantemente a eumenitin, EM1 e EM2 inibem a atividade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com espectros e eficiência comparáveis, enquanto EM3 e EM4 não apresentam atividade antimicrobiana. Nenhum dos quatro peptídeos desta série apresenta significativa atividade hemolítica. EM3 e EM4 estimulam apenas moderadamente a degranulação de mastócitos, da mesma forma que eumenitin, porém EM1 e EM2 são mais ativos. Suas seqüências primárias possuem 14 resíduos, terminal-C amidado e apresentam alto grau de homologia em relação a EMP-AF e eumenitin. EM3 e EM4 são únicos entre os peptídeos de vespa solitária estudados por apresentarem um resíduo negativamente carregado (Asp) na posição 2. Esses dados ainda não foram submetidos à publicação e foram gentilmente cedidos pelo Dr. K. Konno do Instituto Butantan (CAT-CEPID).

Análise conformacional por Dicroísmo Circular

Os espectros obtidos por CD dos peptídeos da série EM1~EM4 estão apresentados na Figura 11. Em água e tampão Tris/borato pH 7,5, esses peptídeos apresentam espectro característico de estruturas aleatórias (random coil), exibindo uma banda dicróica negativa entre 197 e 199 nm. A dissolução desses peptídeos em TFE 40% ou SDS 8 mM resultam em estruturas cujos espectros são característicos de hélice- α , exibindo bandas negativas em 208 e 222 nm e uma banda positiva entre 191 e 193 nm. A razão entre as elipticidades observadas em 222 nm e 208 nm ($[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$) é menor que 1, sinalizando que nesses ambientes os peptídeos apresentam-se como monômeros (Blondelle et al., 1997). Em meio SDS 165 μ M, esses peptídeos dividem-se em dois grupos, EM1 e EM2 cujos espectros de CD são também característicos de hélice- α , e EM3 e EM4 que nessa condição apresentam espectros indicativos de dobras (turns) ou folhas- β , com uma única banda negativa ao redor de 220 e 223 nm e uma banda positiva entre 196 e 197 nm. Em meio SDS monomérico, os estudos de propensão helicoidal conduzidos por Blondelle et al. (1997), indicam que os resíduos Phe, Gly, Val e Ser, que correspondem a aproximadamente 40% dos resíduos desses peptídeos, apresentam propensão para conformação em folhas- β .

Para avaliar o papel das interações eletrostáticas na conformação desses peptídeos obtivemos seus espectros também em um meio catiônico, constituído por uma solução de cloreto de trimetilcetilamônio (CTACl) a 2,8 mM, acima da concentração micelar crítica. Esses espectros mostrados na Figura 12, apresentam uma relação sinal/ruído pior que em SDS, embora tenham sido obtidos nas mesmas condições dos espectros anteriores; os espectros de EM3 e EM4 são característicos da conformação em hélice- α monomérica. Essa pequena estruturação helicoidal, que não se obtém para EM1 e EM2, parece ser o resultado da interação dos resíduos Asp 2 com a superfície catiônica das micelas, pois uma ponte salina

entre esse resíduo e Lys 8 (i, i + 6) seria menos provável. Isso evidencia o papel modulador da presença de cargas negativas nesses peptídeos e reforça a idéia de um possível sinergismo entre as ações desse peptídeos, expandindo o espectro de ação da mistura em relação aos componentes isolados.

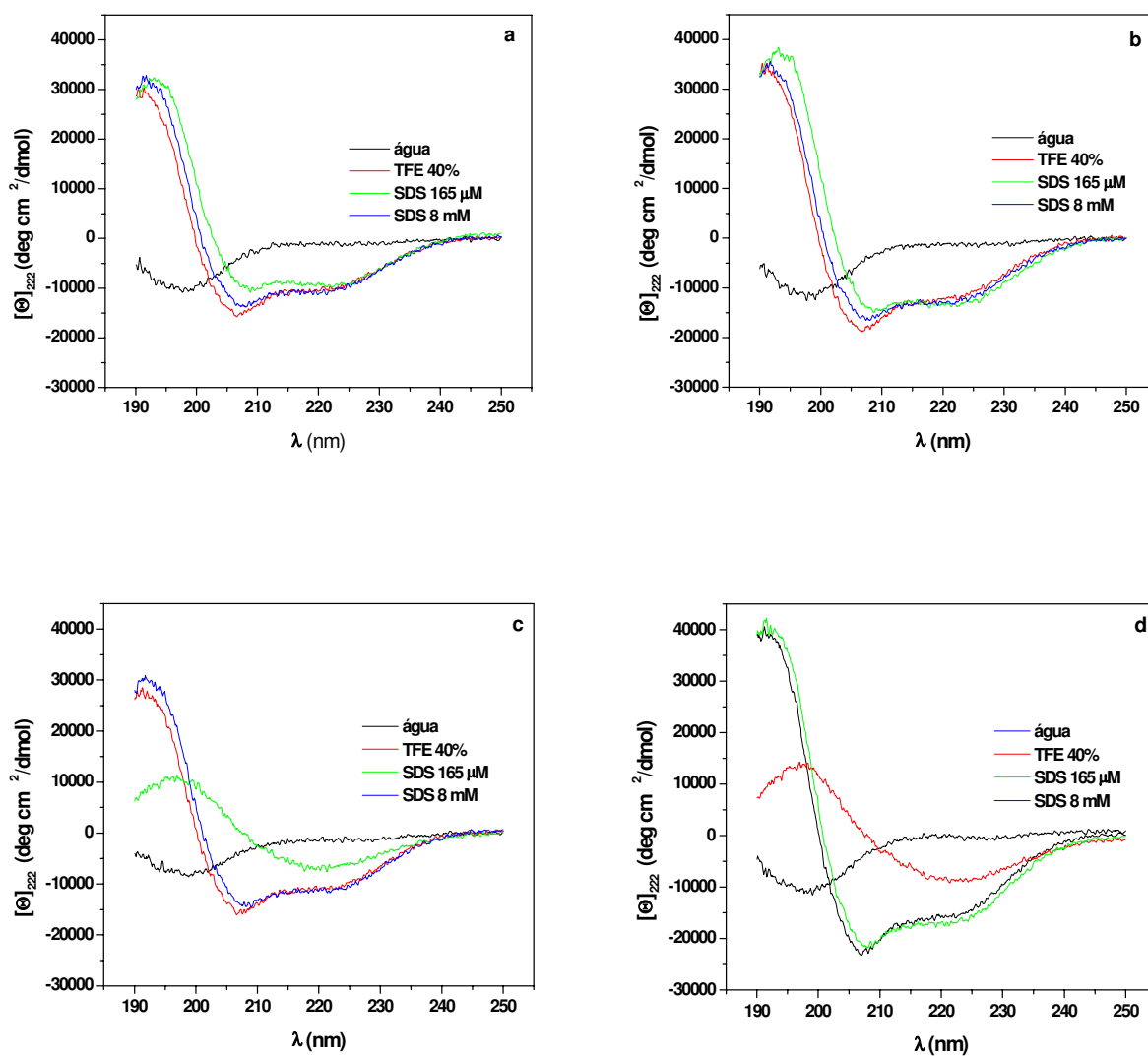


Figura 11: Espectros de CD dos peptídeos da série EMP-EM1~4, a 25°C, sendo (a) EM1, (b) EM2, (c) EM3, e (d) EM4, em (—)água, (—) TFE 40%, (—) SDS 165 μM e (—) SDS 8 mM.

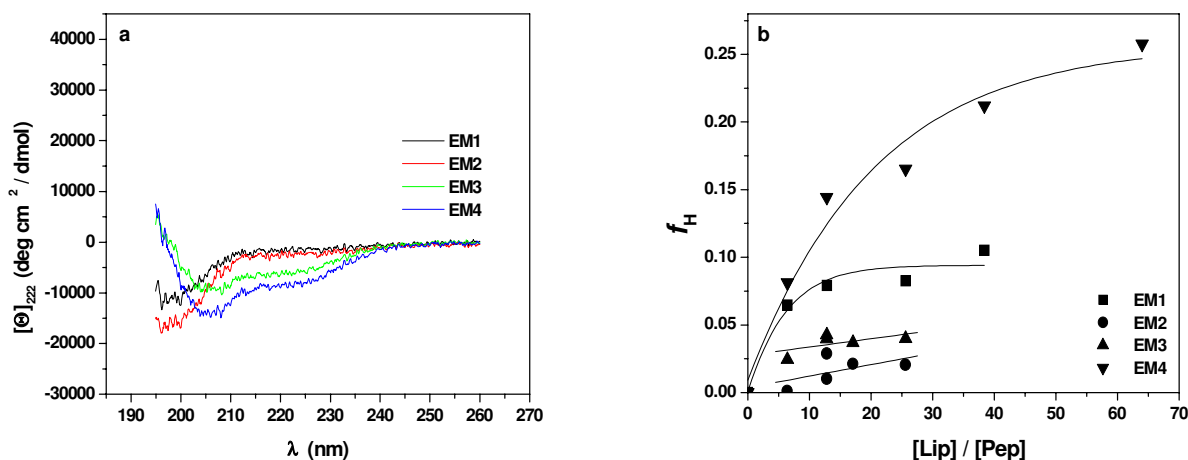


Figura 12a: Espectros de CD a 25°C, de EMP-EM1 (—), EMP-EM2 (—), EMP-EM3, (—) e EMP-EM4 (—) em CTACl 2,8 mM.

Figura 12b: Dependência do teor de hélice- α (f_H) dos peptídeos (■) EM1, (●) EM2, (▲) EM3 e (▼) EM4 com a razão entre as concentrações de PC e peptídeo (L / P).

As isotermas de associação dos peptídeos EM1~4 com vesículas PC estão mostradas na Figura 12b. Baixa fração de hélice- α é induzida nesses peptídeos em interação com vesículas zwitteriônicas, o que está bem correlacionado à ausência de atividade hemolítica. Isso sugere que as maiores elipticidades observadas em meios aniônicos são o resultado da maior importância das interações eletrostáticas na determinação da estrutura secundária.

A Tabela 7 reúne os resultados de CD a outros parâmetros estruturais, destes peptídeos, de eumenitin e EMP-AF. Os quatro peptídeos apresentam momentos hidrofóbicos semelhantes, comparáveis a eumenitin, no entanto, este, com carga líquida intermediária e hidrofobicidade bastante menor, apresenta fração de hélice- α superior a todos eles, exceto EM4. A série EMP-EM1~4 apresenta as maiores hidrofobicidades médias dentre os peptídeos estudados, sem contudo apresentarem atividade hemolítica. Os quatro peptídeos apresentam um resíduo carregado na posição 2, sendo que EM1 e EM2 apresentam uma Lys e EM3 e EM4 um Asp; isso faz com que os dois primeiros apresentem uma carga líquida mais alta que os demais, e que provavelmente é responsável pela sua atividade antimicrobiana (Dathe et al., 2001). A diferença entre os teores helicoidais de EM3 e EM4, tanto em TFE como em SDS, refletem a influência de uma única diferença na seqüência primária desses peptídeos, na posição 3. A presença de uma Ile em EM3 provavelmente causa um impedimento estérico ao equilíbrio hélice-coil desse peptídeo.

Tabela 7. Propriedades estruturais de EMP-EM1~4 (10 μM) em comparação a eumenitin (8,5 μM) e EMP-AF (10 μM), e suas respectivas frações de hélice- α (f_H).

	Q ¹	H	μ	f_H			
				TFE ²	SDS ³	CTACI ⁴	PC
EMP-EM1	+4	0,104	0,258	0,305	0,332	<0,02	0,105 ⁵
EMP-EM2	+4	0,138	0,278	0,367	0,407	<0,02	<0,03 ⁵
EMP-EM3	+2	0,163	0,251	0,324	0,361	0,137	<0,03 ⁵
EMP-EM4	+2	0,149	0,238	0,482	0,539	0,246	0,260 ⁶
Eumenitin	+3	0,002	0,265	0,43	0,50	nd	0,11 ⁵
EMP-AF	+4	0,051	0,342	0,55	0,72	nd	0,16

¹ inclui uma carga adicional relativa ao terminal-C amidado; ² 40% TFE;

³ > 8.0 mM SDS; ⁴ 2,8 mM CTACI; ⁵ razão L/P = 38:1; ⁶ razão L/P = 57:1; nd = não determinado.

Análise da atividade lítica

A atividade lítica dos peptídeos da série EMP-EM1~4 em vesículas PCPG 7030 foi avaliada durante 20 minutos de contato, e em vesículas PC durante 30 minutos, com diferentes concentrações de peptídeo. As Figuras 13 e 14 mostram as curvas de dose-resposta obtidas, considerando % vazamento após 3 e 5 minutos de contato, respectivamente. Esses gráficos indicam que o processo de liberação do conteúdo de vesículas por EM1~4 é cooperativo, assim como encontrado para EMP-AF e Eumenitin.

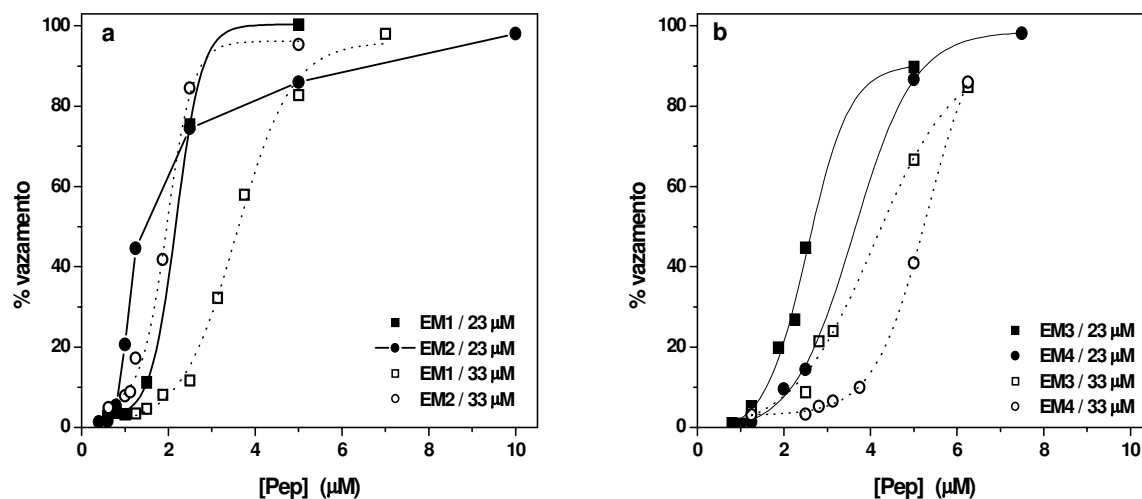


Figura 13: Curvas de dose-resposta, a 25°C, para EM1 e EM2 (a) e para EM3 e EM4 (b) em PCPG 7030 23 μM (símbolos cheios) e 33 μM (símbolos vazados), após 3 minutos de contato.

A concentração crítica (Figura 13) que induz o vazamento em vesículas PCPG 7030 é da ordem de 1 μM , em baixa concentração de vesículas (23 μM , Figura 13a) e aumenta para cerca de 1,5 μM no caso de EM1 e EM2 ou cerca de 2,5 a 3 μM no caso de EM3 e EM4, quando a concentração de vesículas aumenta (33 μM , Figura 13b).

Na Figura 14 os gráficos apresentam o % vazamento de vesículas PC, após 5 minutos de contato, em função da concentração dos peptídeos. A concentração limite que desencadeia o processo de liberação do conteúdo dessas vesículas é maior do que para as vesículas aniônicas, da ordem de 4 a 15 μM dependendo do peptídeo em 54 μM de lipídeo, sendo que EM3, requer a menor concentração para induzir o processo de vazamento. Em tempos de contato de 30 minutos, os quatro peptídeos atingem 80 a 90% de vazamento, nas concentrações mais elevadas em que foram testados. Em concentração mais elevada de lipídeo, 96 μM , as concentrações limite de peptídeo aumentam para cerca de 12 a 15 μM .

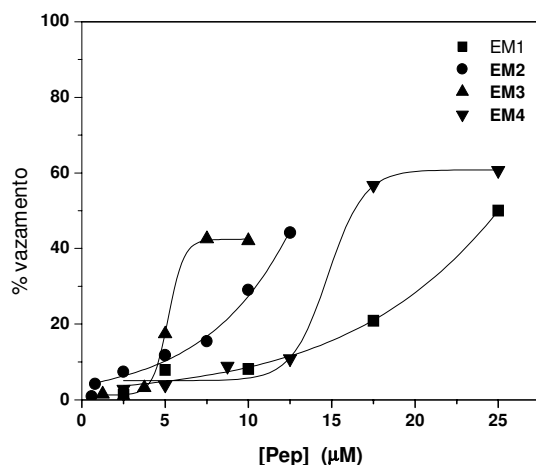


Figura 14: Curvas de dose-resposta a 25°C, em vesículas PC 54 μM para EM1, EM2, EM3 e EM4, com 5 minutos de contato.

O ajuste das isotermas de vazamento (equação 7), tanto em vesículas aniônicas como zwitteriônicas, também mostrou que o processo é semelhante ao descrito para EMP-AF, que as constantes de tempo são inversamente dependentes da razão P/L (Figura 15a e b) e que são mais sensíveis a ela do que a constante $\% V_{\text{max}}$. Dois experimentos independentes foram realizados e com isso obtivemos no mínimo uma curva por experimento onde o ajuste se mostrou adequado. Considerando que os peptídeos mais eficientes na permeabilização de vesículas são aqueles onde a menor relação P/L está associada aos menores valores da constante de tempo, τ , observa-se na Figura 15a que a eficiência de permeabilização de vesículas aniônicas segue a seguinte ordem decrescente EM2>EM1>EM3=EM4, que está bem correlacionada às respectivas atividades antimicrobianas. Comparativamente aos demais peptídeos estudados EM2 é equivalente a EMP-AF e inferior a Eumenitin e MP1 (Figura 35). Entretanto, em

vesículas PC, o vazamento induzido pelos peptídeos da série EM1~4 é significativamente mais lento e dependente de uma relação P/L cerca de 2 a 4 vezes maior.

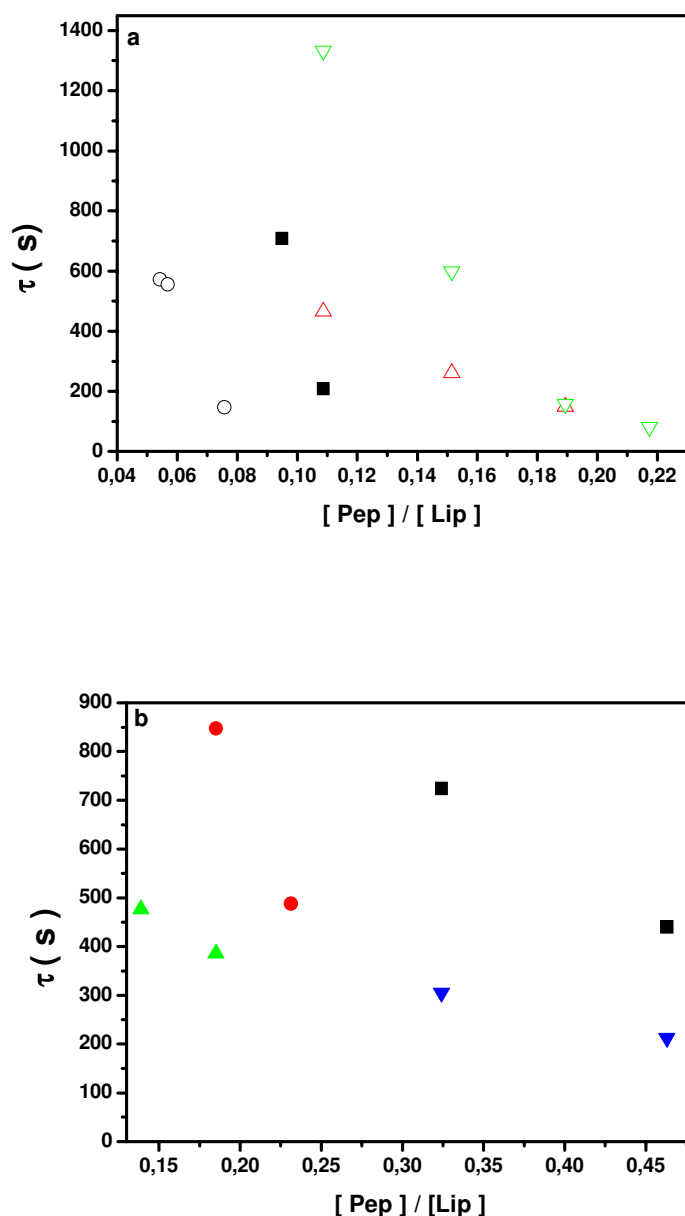


Figura 15: (a) Gráfico da constante de tempo (τ) da cinética de vazamento induzido por EM1 (preto), EM2 (vermelho), EM3 (verde) e EM4 (azul) em vesículas aniônicas, PCPG 7030, em função da concentração P/L mínima em que as respectivas curvas da cinética foram ajustadas. (b) idem para vesículas zwitteriônicas, PC.

A eficiência de permeabilização das vesículas zwitteriônicas segue uma ordem decrescente diferente, sendo $EM3 > EM2 \gg EM1 = EM4$. A diferença de concentração em que a permeabilização de

ambos tipos de vesícula acontece garante a seletividade de EM1 e EM2 em relação às vesículas aniônicas. Porém, EM3 e EM4 não apresentam seletividade em relação a essas vesículas.

Devido às interações observadas em micelas catiônicas de CTACI (Figura 13a), realizamos alguns experimentos de vazamento de vesículas aniônicas e zwitteriônicas na presença de quantidades equimolares entre peptídeo e CTACI. Nessas concentrações, muito menores que a cmc, o surfactante é monomérico. As figuras 16a e b mostram a cinética do processo de vazamento, em vesículas PC e PCPG 7030, respectivamente. O surfactante ao interagir isoladamente com as vesículas provoca um pequeno vazamento de 7% em vesículas PC, que permanece constante ao longo de 40 minutos, e de 5 a 9% em vesículas PCPG 7030, ao longo de 20 minutos de contato. Esses valores são muito menores que os encontrados para qualquer um dos quatro peptídeos da série EM1~4 nas mesmas vesículas. A interação conjunta entre peptídeo e surfactante praticamente extingue a permeabilização das vesículas aniônicas pelos quatro peptídeos e reduz significativamente a fração de CF liberada das vesículas zwitteriônicas. A presença do surfactante catiônico provavelmente compete com os peptídeos pelas regiões próximas às cargas negativas das vesículas, impedindo ou repelindo a ligação destes com a superfície da membrana. Da mesma forma, no caso das vesículas zwitteriônicas, o surfactante provavelmente se liga às vesículas e reduz a afinidade dos peptídeos pela superfície da bicamada.

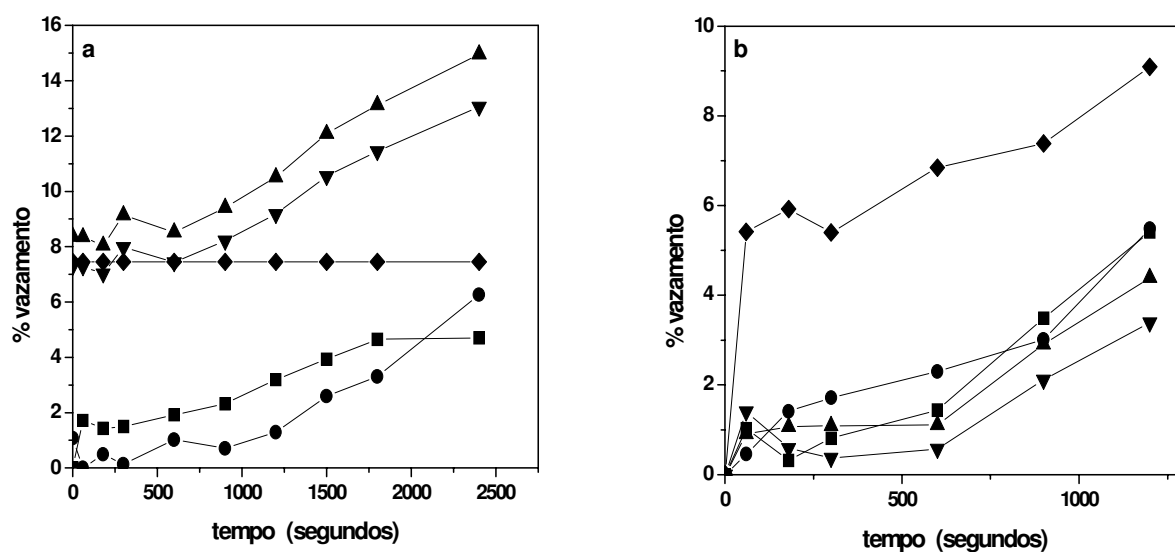


Figura 16: Cinética do vazamento, a 25°C, induzido por EM1~4 com vesículas (a) 54 μM PC e (b) 23 μM PCPG 7030, na presença de CTACI em concentrações equimolares em relação aos peptídeos, sendo em (a) e (b) respectivamente (■) EM1 a 12,5 e 10 μM, (●) EM2 a 10 e 1,25 μM, (▲) EM3 a 10 e 5 μM, (▼) EM4 a 10 e 5 μM, e (◆) CTACI a 12,5 μM.

Em um outro experimento observamos a cinética da permeabilização de vesículas PC por EMP-AF e por EM3, ambos na concentração de 5 μM , na presença e na ausência de 165 μM de SDS em comparação à ação isolada do surfactante (Figura 17). Nesta concentração, muito abaixo da cmc, SDS apresenta-se monomérico, contudo induz expressiva quantidade de estrutura secundária em ambos peptídeos (Figuras 4 e 11c, respectivamente). O que se observa é um significativo aumento da eficiência de permeabilização dessas vesículas por ambos peptídeos, embora o surfactante isolado cause um vazamento inferior a 10% em 20 minutos de contato.

A associação de surfactantes tem ação sinérgica positiva ou negativa na permeabilização de vesículas zwitteriônicas por peptídeos catiônicos dependendo de seu caráter iônico: tensoativos catiônicos apresentam sinergia negativa e vice-versa.

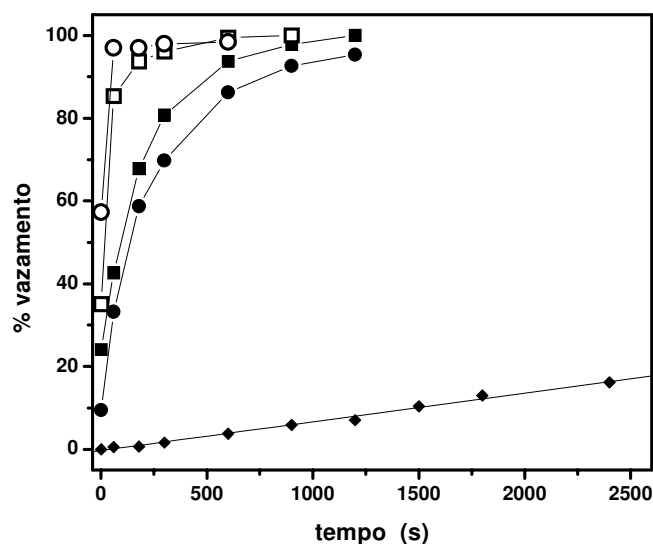


Figura 17: Cinética da interação, a 25°C, de peptídeos catiônicos a 5 μM com vesículas PC a 11 μM , sendo (■, □) EMP-AF e (●, ○) EM3, respectivamente na ausência (símbolos cheios) e na presença (símbolos vazados) de surfactante aniônico (◆) SDS a 165 μM .

5.4 Polybia-MP1 (MP1)

É um peptídeo da família dos mastoparanos, extraído do veneno da vespa social *Polybia paulista*, com catorze resíduos na cadeia peptídica; apresenta potente ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não é hemolítico em eritrócitos de ratos, é desgranulador de mastócitos, e quimiotático para leucócitos polimorfonucleados (PMNL). Ocorre conjuntamente com outro peptídeo de doze resíduos, denominado Polybia-CP, com atividade semelhante, mas que não desgranula mastócitos e é seletivo para bactérias Gram-positivas (Souza et al., 2005), e ainda, ocorre com outros dois peptídeos quimiotáticos e inflamatórios, mas não antimicrobianos, cujo N-terminal é acetilado (Ribeiro et al., 2004).

Análise conformacional por Dicroísmo Circular

As figuras 18a e b mostram os espectros de MP1 a 20 μM , em diferentes ambientes. Em água e tampão Tris/borato os espectros são compatíveis com uma estrutura desordenada, e passam a ser característicos de hélice- α monomérica ($[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208} < 1$) nos demais ambientes testados, apresentando inclusive um ponto isodicroico em 196 nm (Figura 18a), característico da existência de estruturas em apenas dois estados, aleatória e helicoidal (Rohl & Baldwin, 1998). Chuang et al. (1996) e McDowell et al. (1985) apresentam espectros de CD de MP-B em TFE 40% e MP-X em TFE 70%, respectivamente, que também são característicos de hélice- α monomérica, com um ponto isodicroico ao redor de 200 nm. A presença de 150 mM NaF, no tampão Tris/ borato, aumentando a força iônica do meio, alterou o espectro de CD de MP1 em relação ao seu espectro em água, e também o espectro em meio de vesículas PC, mostrando aumento de intensidade das bandas dicroicas em 222 e 208 nm (Figura 18b).

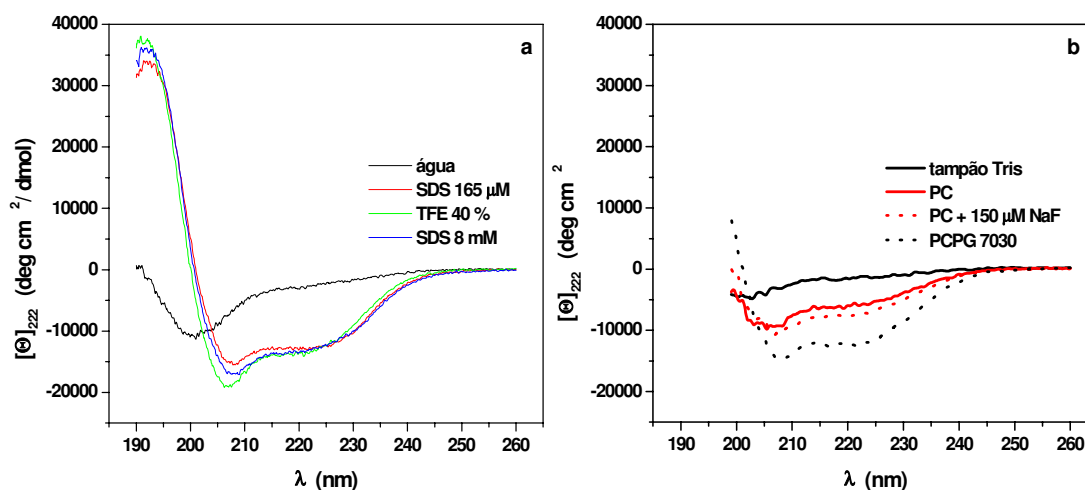


Figura 18: Espectros de CD de MP1 a 20 μM , 25°C : (a) em (—) água, (—) TFE 40%, (—) SDS 165 μM , (—) SDS 8 mM; (b) espectros na presença de (—) tampão Tris pH 7,5, (—) vesículas PC, (....) vesículas PC com adição de 150 mM NaF, (....) vesículas PCPG 7030, respectivamente nas relações L/P de 15:1, 12:1 e 11:1.

Isto não ocorreu com mastoparano-X, cujo espectro de CD em água, característico de estruturas aleatórias, não se alterou pela presença de até 0,5 M de tampão fosfato em pH 7,0 (McDowell et al., 1985), nem o teor de hélice- α , em vesículas zwitteriônicas, pela variação de NaCl na faixa de 0,1 a 0,4 M (Schwarz & Blochmann, 1993). Com MP ocorreu alteração em sentido inverso, ou seja, a elipticidade em vesículas zwitteriônicas decresceu em função do aumento da concentração salina entre 0 e 0,4 M de NaCl (Schwarz & Blochmann, 1993). MP1 e MP-X possuem seqüências primárias bastante semelhantes (Tabela 1), principalmente na região do terminal-N; a diferença mais marcante entre elas é o maior número de resíduos carregados e polares (6 contra 4). Dentre eles, a presença de resíduos negativamente carregados em MP1 que podem estabelecer pontes salinas com os resíduos positivamente carregados, ou um maior número de ligações de hidrogênio com a cadeia principal, em ambientes onde houvesse menor solvatação desses resíduos polares pela água. A influência das interações eletrostáticas na conformação de MP1 também pode ser observada comparando-se o maior teor helicoidal em SDS, o meio mais densamente carregado, com o teor helicoidal em vesículas aniônicas, que por sua vez, é maior que em vesículas zwitteriônicas.

Comparando-se também as seqüências primárias (Tabela 1) de MP1 e MP-B observa-se uma semelhança estrutural acentuada entre elas, quanto ao posicionamento dos resíduos carregados e polares, intercalados por resíduos apolares de dimensões semelhantes. A Tabela 8 mostra outras semelhanças estruturais entre MP1, MP-B e MP-X, todos mastoparanos de vespa social. Apesar da diferença no valor da carga líquida, MP1 e MP-B apresentam hidrofobicidade negativa e momento hidrofóbico da mesma ordem. A elipticidade de MP1 e MP-B (Park et al., 1995) em vesículas PCPG 7030 e em vesículas PC também é bastante semelhante, em condições similares de razão L/P.

Tabela 8. Características estruturais de MP1, inclusive fração de hélice- α , em diversos ambientes, a 20 μ M, comparativamente a EMP-AF, MP-B e MP-X.

	Q	H	μ	f_H			
				40% TFE	SDS ¹	PCPG	PC
MP1	+2	-0,108	0,297	0,427	0,413	0,399 ²	0,177 ³
EMP-AF	+4	0,051	0,341	0,545	0,721	0,731 ⁴	0,162 ⁵
MP-B	+5	-0,064	0,270	0,497 ⁶	-	0,366 ⁷	0,165 ⁷
MP-X	+4	0,009	0,209	0,61 ⁸	-	-	0,61 ⁹

¹ 8.0 mM SDS; ² razão L/P = 11:1; ³ razão L/P = 15:1; ⁴ razão L/P = 2,6:1; ⁵ razão L/P = 6,3:1; ⁶ calculado a partir de Chuang et al., 1996; ⁷ calculado a partir de Park et al., 1995, na razão L/P = 10:1; ⁸ calculado a partir de McDowell et al., 1985 em 70% TFE; ⁹ calculado a partir de Schwarz & Blochmann, 1993.

Espectros de fluorescência de Trp obtidos para MP1 a 10 μM em SUV PC a 53 μM , indicam que MP1 não penetra na membrana, pois a fluorescência do Trp não apresenta nem intensidade aumentada, nem deslocamento para as regiões de menor comprimento de onda, característicos desse resíduo em meios mais hidrofóbicos (figura 19). Contrariamente, os espectros de fluorescência de MP-X que também possui um resíduo Trp na posição 3, sugerem que ele penetra em meio mais hidrofóbico, mas se localiza próximo à superfície da vesícula (Matsuzaki et al., 1996a). A menor interação de MP1 com vesículas zwitteriônicas é compatível com a baixa atividade hemolítica deste peptídeo (Souza et al., 2005); já MP-B que é mais hemolítico que MP, penetra no core hidrofóbico de vesículas DPPC a partir da relação L/P = 24:1, como indicado pelo aumento da intensidade e deslocamento da fluorescência do resíduo de Trp para menores comprimentos de onda (Park et al., 1995). Essa diferença de comportamento entre peptídios tão semelhantes poderia ser explicada pelo maior número de cargas positivas de MP-B, o maior dentre os mastoparanos de vespas sociais comumente estudadas (Park et al., 1995) e que é também o maior dentre os mastoparanos de vespas solitárias já identificados (K. Konno, comunicação pessoal). Segundo Dathe et al. (2001), existe uma relação direta entre o aumento do número de cargas positivas, além de certos limites, e o aparecimento de atividade hemolítica. MP-B é mais hemolítico que MP, e este é 10 vezes mais hemolítico que EMP-AF (Konno et al., 2000), mas ambos, MP-B e EMP-AF, apresentam o mesmo teor de hélice- α , confirmando a tendência de maior caráter hemolítico para peptídios com cationicidade acima da média. Nesse sentido a maior seletividade de MP1 em relação a MP-B e EMP-AF pode ser atribuída à sua menor carga líquida.

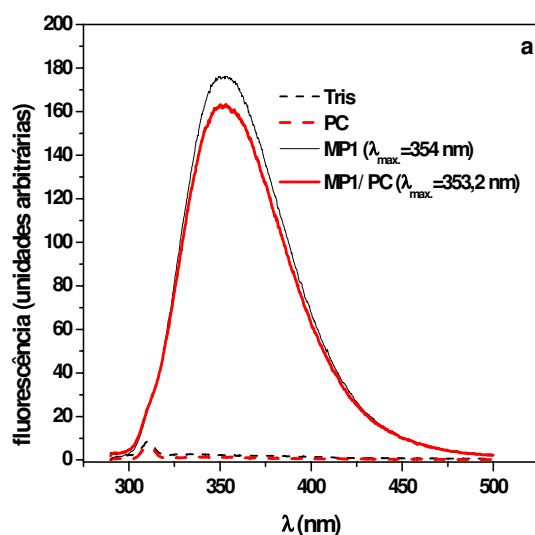


Figura 19: Espectros de fluorescência de MP1 10 μM , a 25°C, na presença de tampão Tris, pH 7,5 (traço preto) e na presença de vesículas PC 53 μM (traço vermelho).

Análise da atividade lítica

A atividade lítica de MP1 foi estudada em vesículas zwitteriônicas (PC) e em diferentes composições lipídicas aniônicas, PCPG 7030, PCCL 7030 e PCCL 4060. A camada externa da membrana de bactérias é caracterizada por uma alta densidade de carga negativa e interações eletrostáticas são reconhecidamente determinantes da ligação entre peptídios e membranas (Yeaman & Yount, 2003; Lohner & Prenner, 1999). Para mimetizar essas características das membranas bacterianas, usamos PG e CL, variando a densidade de carga negativa da bicamada. A cardiolipina é uma forma dimérica de fosfatidilglicerol, com 4 grupos alquílicos e duas cargas negativas, uma em cada grupo fosfato. A Figura 20a ilustra o processo de permeabilização. Em 5 minutos de contato e numa relação L/P de 20:1 ou 12,5:1, MP1 induziu liberação quase completa do conteúdo das vesículas PCPG 7030 ou PCCL 7030, respectivamente, enquanto cerca de 50% do conteúdo das vesículas PC e das PCCL 4060 foi liberado no mesmo intervalo de tempo, nas razões 25:1 e 7,5:1. Essas curvas da cinética de vazamento são características de processos em duas etapas, com uma fase inicial de liberação rápida, seguida de uma fase lenta, de liberação desacelerada, bastante semelhante ao verificado para EMP-AF em vesículas PCPG 7030; as constantes de tempo (τ) e valores de vazamento máximo (V_{\max}) estão indicadas na Figura 20b. EMP-AF, entretanto, demonstrou ser mais eficiente do que MP1, pois sua eficiência ocorreu em uma relação L/P de 10:1, enquanto para MP1 essa relação variou entre 4 a 5:1.

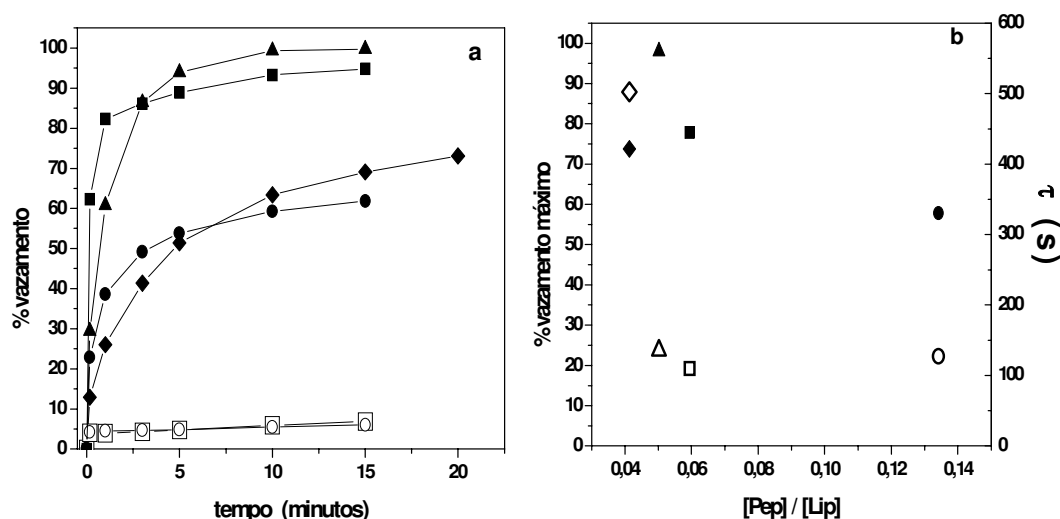


Figura 20a: Cinética do vazamento de vesículas causado pela interação com MP1 a 5 μM em (◆) PC, (▲) PCPG 7030, (◻) PCCL 7030, (○) PCCL 4060, e a 20 μM em (■) PCCL 7030 (●) PCCL 4060. Figura 20b: % Vazamento máximo (símbolos cheios) e constante de tempo (τ , símbolos vazados) obtidos pelo ajuste da curva de cinética de MP1 para as mesmas vesículas nas respectivas razões entre as concentrações molares de peptídio e lipídio (razão [Pep]/[Lip]).

A inclusão de fosfolipídios aniônicos, tanto PG como CL, em vesículas PC afeta principalmente τ , que está ligada à velocidade de formação de aberturas na bicamada, muito mais do que V_{max} , que está relacionada ao número de aberturas ou à condutância dessas aberturas (Allende et al., 2005). Isso demonstra também a interação preferencial de MP1 com vesículas aniônicas, pois nestas τ é significativamente menor do que para vesículas zwitteriônicas. A eficiência de permeabilização de vesículas segundo sua composição se deu na seguinte ordem decrescente: PCPG 7030 > PCCL 7030 >> PC ou PCPG 7030 > PCCL 7030 >> PCCL 4060.

As curvas de dose-resposta para MP1 estão apresentadas na Figura 21 e indicam um processo cooperativo para todos os tipos de vesículas testadas. As doses que induzem o vazamento de vesículas PC e PCPG 7030 são da ordem de $1 \mu\text{M}$, enquanto nas vesículas PCCL essa concentração limite aumenta para $10 \mu\text{M}$, para um tempo de contato de 5 minutos. Esses resultados estão bem correlacionados aos encontrados por Matsuzaki et al. (1998b), mostrando que magainina permeabiliza mais eficientemente vesículas contendo o fosfolipídio aniônico PG do que aquelas que contém outros fosfolipídios aniônicos como PS, PA ou CL. Como os experimentos foram realizados em diferentes concentrações de fosfolipídios, é mais adequado observar a dependência do % vazamento com a razão P/L (Figura 21b), que evidencia a forte dependência da eficiência de permeabilização com a quantidade de lipídio. A fase rápida do processo de vazamento é induzido em vesículas PCPG 7030 e PC a partir da relação P/L de 1:40, enquanto em vesículas PCCL 7030 essa relação é de 1:30 e de 1:15 em PCCL 4060.

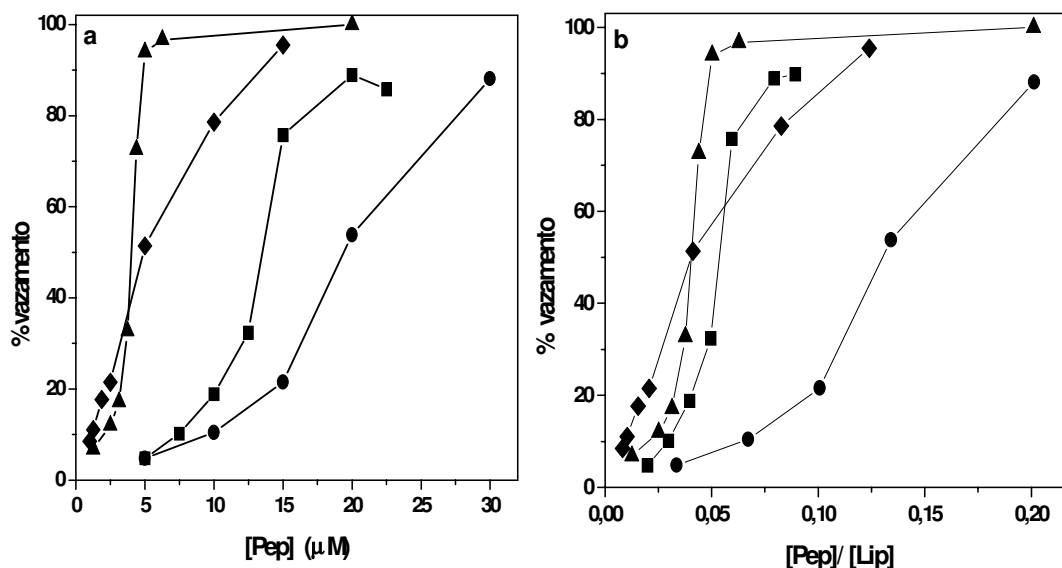


Figura 21: Curvas de dose-resposta para MP1, após 5 minutos de contato, em função da concentração de peptídeo (a) e da razão L/P (b) em vesículas zwitteriônicas, (◆) PC, e aniônicas (▲) PCPG 7030 (■) PCCL 7030 (●) PCCL 4060.

Embora as interações eletrostáticas determinem a seletividade de MP1 a vesículas aniônicas, a eficiência de permeabilização de MP1 nas vesículas estudadas parece depender também de outros parâmetros além da quantidade de cargas negativas: nos três tipos de vesículas aniônicas estudadas, a densidade de carga negativa segue a seguinte ordem decrescente: PCCL 4060 > PCCL 7030 > PCPG 7030, cada uma apresentando praticamente o dobro de cargas negativas em relação à seguinte. Porém, a eficiência de permeabilização segue a ordem inversa. A membrana externa das bactérias Gram-negativas, assim como as cabeças polares das micelas de SDS, apresentam densidade de carga negativa maior que em vesículas 100% PG (Dathe et al., 2002 e 1996), que por sua vez terá maior densidade de carga que as misturas PCPG e PCCL estudadas. Se a interação eletrostática é responsável pela ligação de MP1 às bicamadas aniônicas, poderíamos esperar que vesículas contendo CL, que é quase duas vezes mais negativamente carregada do que PG, deveriam favorecer a ligação do peptídeo e com isso apresentar um vazamento maior; porém, a presença de CL causa um efeito de estabilização em bicamadas PC (Schlame et al., 2000), por induzir curvatura espontânea negativa em bicamadas (Allende et al., 2005), e agindo contrariamente aos peptídeos catiônicos que induzem curvatura positiva.

Isto explica porque as vesículas PCCL 7030 e PCCL 4060 requerem maiores concentrações de MP1 - um peptídeo com carga líquida relativamente baixa - do que as membranas PC isoladamente ou a mistura PCPG 7030 para induzir um vazamento expressivo. Nas vesículas PCCL 7030, onde MP1 apresenta eficiência de permeabilização semelhante à que ocorre em vesículas PCPG 7030, parece haver uma certa compensação de efeitos entre maior interação eletrostática e um certo grau de curvatura negativa; em PCCL 4060 o efeito da curvatura negativa prevalece. Em membranas de eucariotos que contém colesterol, efeito similar de estabilização deve colaborar para que MP1 não apresente atividade hemolítica; neste caso, porém, o efeito é devido a um aumento nos módulos de compressibilidade e de flexão da bicamada provocados pela presença de colesterol (Allende et al., 2005).

Dados obtidos por Matsuzaki et al. (1996a), da atividade lítica de MP-X em vesículas PCPG 9505 e PCPG 7030, indicam forte preferência pelas vesículas mais densamente carregadas e maior eficiência de permeabilização de MP-X nas vesículas PCPG7030 do que observamos com MP1. MP-X tem uma concentração limite da ordem de 1:100 e produz 70% de vazamento em vesículas PCPG 7030 em 5 minutos de contato, na relação P/L = 0,025, num processo também cooperativo, enquanto MP1 inicia sua fase rápida nessa concentração.

A presença de fosfolipídios negativamente carregados nas vesículas, como em PCPG 7030, aumenta a interação de MP1 (Figura 20b e 21), verificada pelo aumento de vazamento em relação a vesículas PC e, semelhantemente ao encontrado com MP-X (Matsuzaki et al., 1996a), confirmando a importância das interações eletrostáticas. Porém, a presença da CL provavelmente obstruiu a inserção mais profunda de MP-X nas vesículas que continham esse fosfolipídio aniônico (De Kroon, et al.1991), assim como também encontramos que vesículas contendo CL apresentam menor vazamento que aquelas que contém PG. Isto mostra que a eficiência de permeabilização depende tanto da presença de lipídios negativamente carregados quanto da composição desses lipídios.

5.5 Anoplin (ANP)

É um dos menores peptídeos antimicrobianos naturais já encontrados. Trata-se de um decapeptídeo cujo terminal-C é amidado, e foi isolado a partir do veneno da vespa *Anoplius samariensis*; apresenta atividades antimicrobiana e de desgranulação de mastócitos, sem ser hemolítico (Konno et al., 2001). Essas atividades biológicas são abolidas pela simples desamidação de seu terminal-C, que produz o análogo denominado Anoplin-OH (ANP-OH, K. Konno, comunicação pessoal). Resultados anteriores [Konno et al., 2001; Ifrah et al., 2005] sugeriram que a seqüência primária e provavelmente a estrutura secundária adotada na interação com membranas biológicas são importantes para modular as atividades biológicas.

Análise conformacional por Dicroísmo Circular

Anoplin-NH₂ apresenta espectros característicos de estruturas randômicas em água, tampão PBC 1 mM e Tris/borato pH 7,5, e em contato com vesículas zwitteriônicas (PC). Em ambientes aniônicos como vesículas PCPG 7030 ou SDS abaixo e acima da concentração micelar crítica, e também em TFE 40%, seus espectros são característicos de estruturas secundárias helicoidais, com duas bandas dicróicas em 208 e 222 nm, como mostrado na Figura 22a. O mesmo tipo de transição foi observado para Anoplin-OH, porém apresentando teores de hélice- α um pouco inferiores (Figura 22b). Ambos peptídeos apresentam menor ellipticidade em TFE 40% do que em SDS. A Tabela 9 apresenta um resumo desses resultados e outros obtidos a 20 μ M de peptídeo.

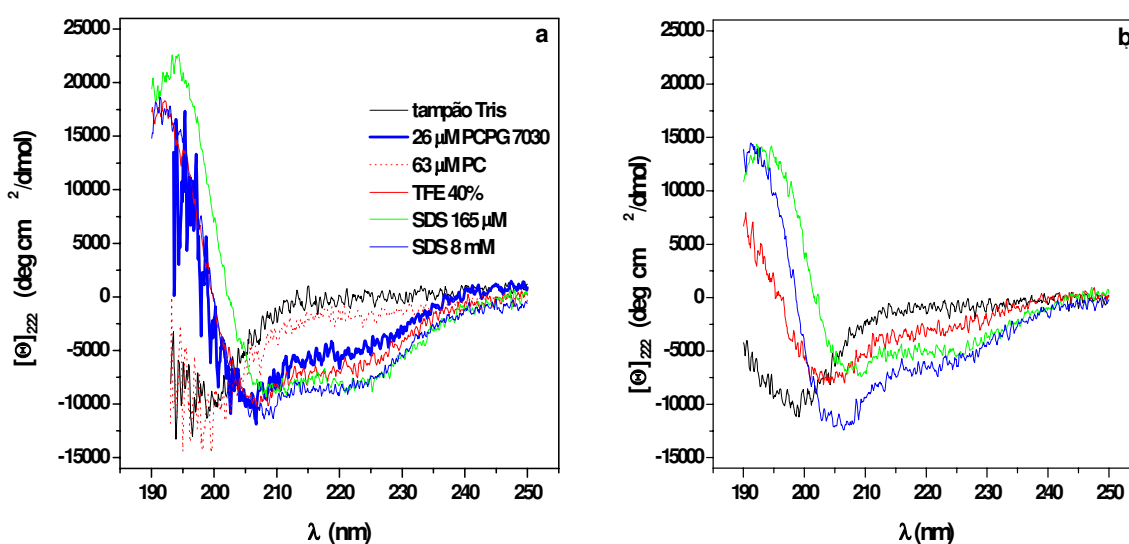


Figura 22: Espectros de CD de (a) Anoplin-NH₂ e (b) Anoplin-OH a 10 μ M, em (—) água ou tampão Tris, (—) TFE 40%, (—) SDS 165 μ M, (—) SDS 8 mM; (....) 63 μ M vesículas PC, (—) e 26 μ M vesículas PCPG 7030.

Diferenças de teor helicoidal de um mesmo peptídeo em função de diferentes solventes são comuns na literatura (Zhong & Johnson, 1992; Waterhous & Johnson, 1994; Deber & Li, 1995; Park et al., 1995; Blondelle et al., 1997). Isso indica uma estrutura flexível (Siligardi & Drake, 1995), que pode interagir com uma maior variedade de membranas (Tossi et al., 2000); por outro lado, Pathak et al. (1995) consideram que essas medidas não representam a estrutura secundária do peptídeo na membrana, mas indicam a tendência relativa de um peptídeo em assumir uma conformação em hélice- α .

Tabela 9: Elipticidade molar ($[\Theta]_{222}$, deg cm²/dmol) em 222 nm e correspondente fração de hélice- α para ANP-NH₂ e ANP-OH a 20 μ M (f_H) e a 10 μ M (f_{H10}), em diferentes ambientes.

	Anoplin-NH ₂			Anoplin-OH		
	$[\Theta]_{222}$ (deg cm ² /dmol)	f_H	f_{H10}	$[\Theta]_{222}$ (deg cm ² /dmol)	f_H	f_{H10}
Água	-1209,69	rc	rc	-1548,57	rc	rc
SDS 8 mM	-13306,9	0,474	0,259	-10129,50	0,417	0,247
Tampão PBC	-1137,92	rc	-	-1138,40	rc	-
SDS 8 mM/tampão	-8649,60	0,302	-	-7762,81	0,315	-
TFE 40%	-	-	0,237	-	-	0,113
PC	-1195,88	rc	rc	-697,782	rc	-
PCPG 7030	-8124,95	0,282	0,212	-7231,21	0,293	-

rc = estrutura randômica

Embora a razão entre as elipticidades observadas em 222 nm e 208 nm seja menor que 1, sinalizando que nesses ambientes os peptídeos apresentam-se como monômeros (Blondelle et al., 1997), encontramos diferentes teores de hélice- α dependendo da concentração de peptídeo em que as medidas foram realizadas, o que poderia sugerir um processo de agregação. Devido ao pequeno comprimento de Anoplin-NH₂, sua atividade também poderia ser atribuída a um processo de agregação. Para verificar esse aspecto, determinamos a variação da fração de hélice- α em função da concentração de SDS (Figura 23a) e também em função da concentração de peptídeo (Figura 23b). A fração de hélice- α independe da concentração de SDS acima da cmc. Também não foi detectada nenhuma dependência com a concentração de peptídeo na presença isolada de tampão PBC, porém em solução tamponada de SDS 8 mM, existe uma certa dependência para Anoplin-NH₂, em concentrações inferiores a 20 μ M. A adição de 150 mM de NaF, juntamente com a solução tamponada de SDS, também não alterou esse perfil de dependência em relação à concentração, e a fração helicoidal também não se alterou significativamente. Assim, assumimos que a conformação helicoidal foi estabilizada nessas condições (Chuang et al., 1996) e que os peptídeos estão presentes na forma monomérica (Blondelle et al., 1997; Deber & Li, 1995; Zhong & Johnson, 1992; Marqusee et al., 1989) na faixa de concentração entre 20 a 100 μ M nesses ambientes.

Quando verificamos a dependência da fração helicoidal com a concentração de peptídeo em vesículas PCPG 7030, encontramos que na faixa entre 5 e 25 μ M de Anoplin-NH₂ a dependência existe,

como indicado na Figura 23c. Curiosamente a 25 μM o peptídeo apresenta menor fração de hélice- α ; isso já havia sido observado para o peptídeo MP em vesículas PC (Schwarz & Blochmann, 1993). Esses autores concluíram que a estabilidade da estrutura secundária dependia da força iônica do meio; Wieprecht et al. (1997a) e Dathe et al. (2001) sugeriram, em situação semelhante, que o conjunto estrutural lipídeo/peptídeo pode ter atingido um máximo em seu processo de ligação, ou ainda, que interações eletrostáticas repulsivas passem a acontecer entre resíduos positivamente carregados, acima de uma determinada concentração de peptídeo (Schwarz & Blochmann, 1993). Em qualquer caso, a susceptibilidade da estrutura secundária de ANP-NH₂ e ANP-OH em relação às interações eletrostáticas com o ambiente ficou demonstrada.

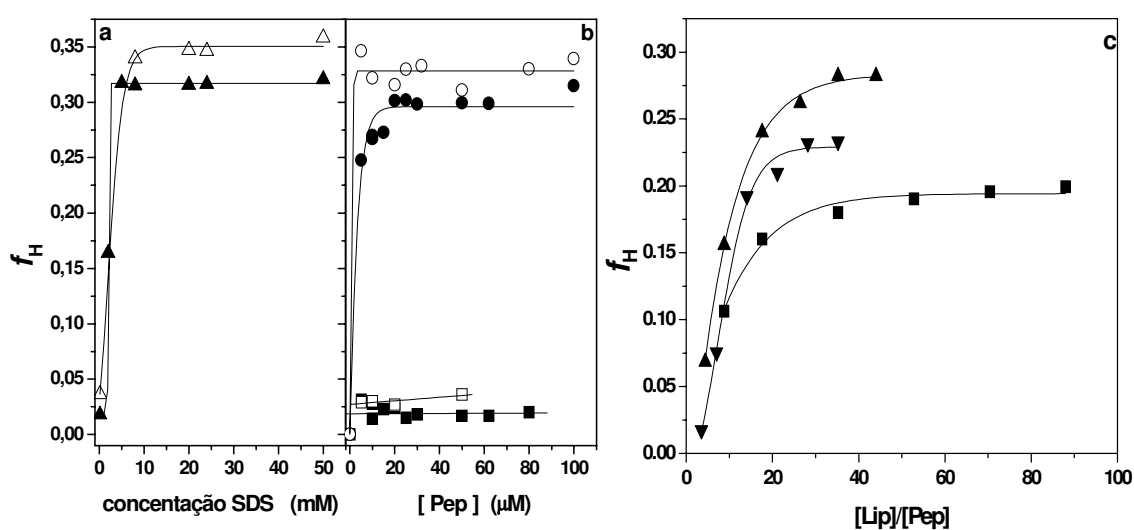


Figure 23: (a) Dependência da fração de hélice α de Anoplin-NH₂ (\blacktriangle) e de Anoplin-OH (\triangle) com a concentração de SDS; (b) Dependência da fração de hélice- α com a concentração de Anoplin-NH₂ em tampão PBC, pH 7,5 (\blacksquare) e em solução tamponada de SDS 8 mM (\bullet) comparativamente a Anoplin-OH em tampão (\square) e em SDS (\circ). (c) Dependência da fração de hélice α com a razão molar entre as concentrações de lipídeo e peptídeo ($[\text{Lip}]/[\text{Pep}]$) para Anoplin-NH₂ a 10 μM (\blacksquare), 20 μM (\blacktriangle) e 25 μM (\blacktriangledown) em vesículas PCPG 7030.

Análise da atividade lítica

A permeabilização de bicamadas induzida por Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH foi investigada acompanhando-se a liberação de CF contida em vesículas zwitteriônicas, PC, e aniônicas, PCPG (7030 e 4060) e PCCL (7030 e 4060). PG e CL foram usados para mimetizar as propriedades aniônicas das membranas bacterianas, variando-se pela composição, a densidade de carga negativa da bicamada.

Anoplin-NH₂ (Figura 24a) e Anoplin-OH (Figura 24b) na concentração de 5 μM e com até 20 minutos de contato induziram menos de 10% de vazamento de CF de todas as vesículas aniônicas testadas.

Mesmo na concentração de 20 μM esses peptídeos não causaram maior permeabilização, para um tempo de contato de 5 minutos. Nessa concentração e considerando-se um tempo de contato de 20 minutos, ocorreu um incremento significativo. Entretanto, com exceção da cinética de interação com vesículas PCPG 4060, das demais não é possível inferir que haja cooperatividade no processo ainda que o aumento da concentração dos lipídeos aniônicos, PG ou CL, na composição das vesículas esteja diretamente correlacionado ao aumento de vazamento.

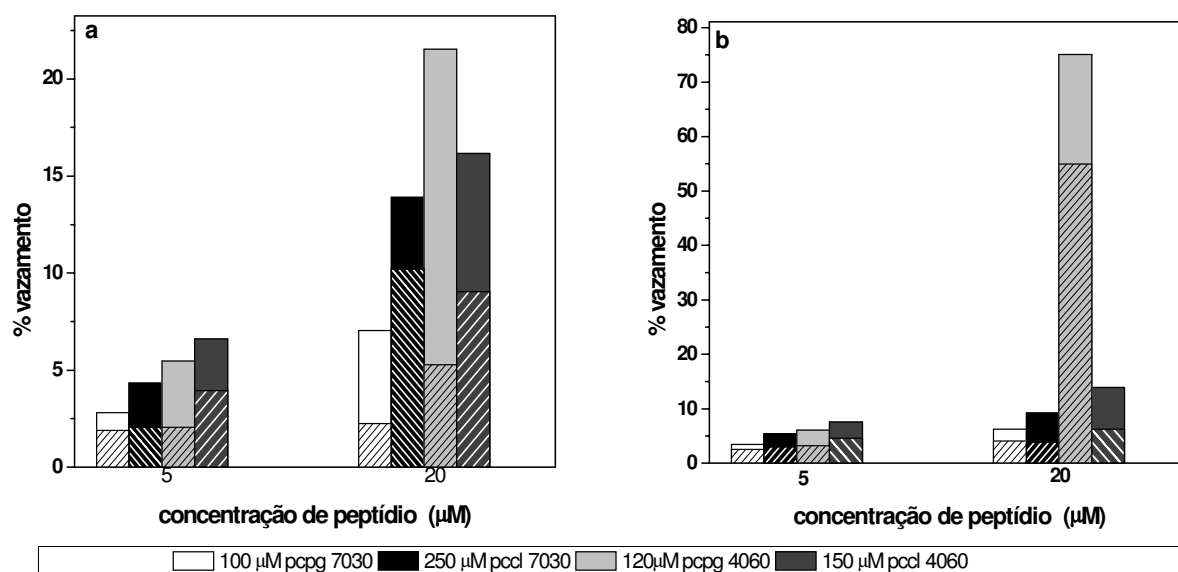


Figura 24: % vazamento causado por (a) Anoplin-NH₂ e (b) Anoplin-OH em vesículas aniônicas em 5 minutos de contato (barras hachuradas) e 20 minutos (barras lisas).

A Figura 25 ilustra as cinéticas de vazamento de vesículas (a) PCPG 4060 e (b) PC de Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH. O perfil da cinética que se observa para ambos peptídeos a 5 μM em vesículas PCPG 4060 é o mesmo que se observa nas demais vesículas aniônicas, mesmo aumentando-se a concentração dos peptídeos até 20 μM . Este comportamento não era esperado para Anoplin-NH₂, um peptídeo antimicrobiano, apesar do pequeno comprimento da sua cadeia. Porém, em 20 μM e com 20 minutos de contato, condições menos rígidas do que as praticadas em testes de ação antimicrobiana, ambos peptídeos, mas especialmente Anoplin-OH, apresentam uma cinética de vazamento diferenciada: esta permeabilização da bicamada é comparável àquela de outros peptídeos antimicrobianos que possuem maiores cadeias (dos Santos Cabrera et al., 2004; Matsuzaki et al., 1995b; DeGrado et al., 1982). Também inesperado é o fato de que a forma carboxilada causou maior vazamento do que a forma amidada, pois com outros peptídeos estudados, como EMP-AF, a forma amidada se apresentou mais eficiente. Em vesículas PC, como ilustrado na Figura 25b, Anoplin-OH também provocou uma maior permeabilização.

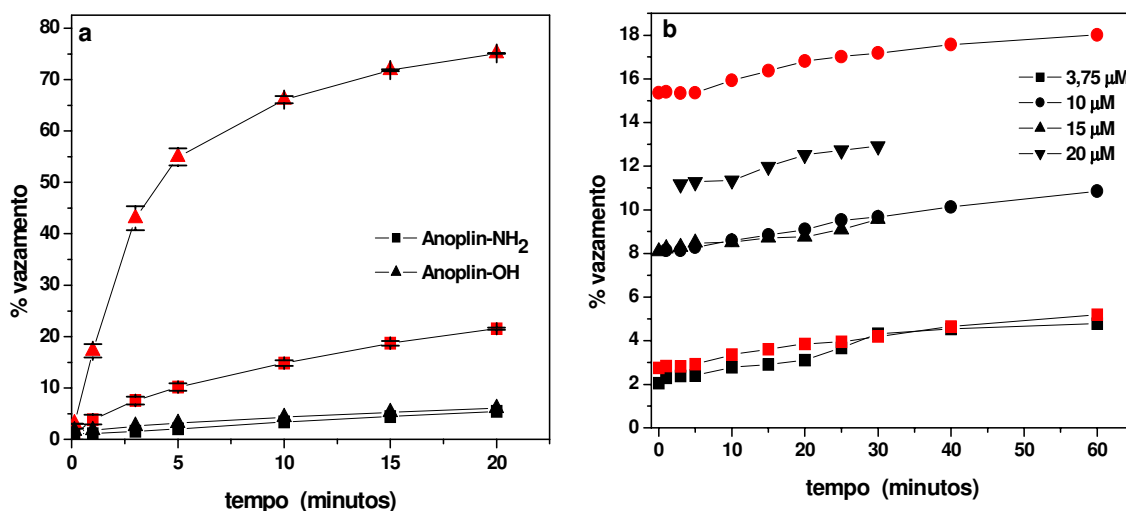


Figura 25: (a) Cinética do vazamento de vesículas PCPG 4060 a 120 μM causado por 5 μM (em preto) e 20 μM (em vermelho) de Anoplin-NH₂ (■) e Anoplin-OH (▲); (b) idem em 150 μM PC para Anoplin-NH₂ (em preto) e Anoplin-OH (em vermelho). Desvio padrão <1% indicado para ambos peptídeos na concentração de 20 μM .

De forma geral, ambos peptídeos causam vazamento igualmente pequeno, tanto em vesículas zwitteriônicas como aniônicas, quando em baixa concentração; em maiores concentrações o vazamento é correspondentemente maior, o que sugere um processo cooperativo, que no entanto não pode ser confirmado, devido à mínima extensão do vazamento, como indicado no exemplo da Figura 26. É comum na literatura associar vazamento de vesículas com a perturbação exercida pelo peptídeo na região central da bicamada (Dathe et al., 2001); nesse sentido poderíamos considerar que ambos Anoplins interagem minimamente com essa região.

Como a única diferença entre esses peptídeos é a natureza do terminal-C, a maioria de suas características físico-químicas são as mesmas, e as diferenças na atividade biológica poderiam ser atribuídas à diferença na carga líquida ou ao efeito do macrodipolo da hélice. O fato de Anoplin-NH₂ apresentar atividade antimicrobiana e de não termos observado expressivo vazamento nos diversos tipos de vesículas testadas sugere que ele exerça sua atividade por um mecanismo não-lítico, onde a extensão das interações hidrofóbicas é limitada. Dentre os peptídeos antimicrobianos de veneno de vespa estudados, Anoplin é o único para o qual o mecanismo lítico não pode ser demonstrado.

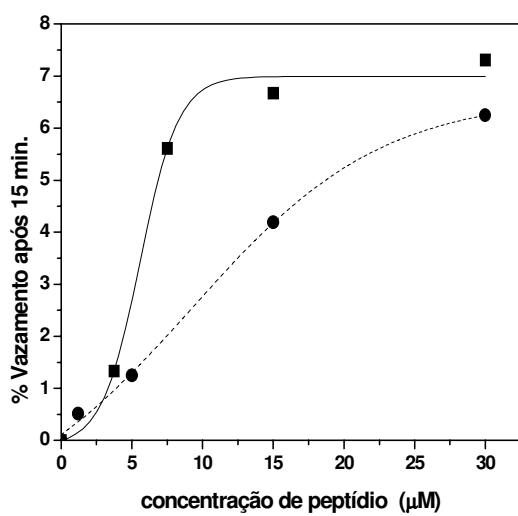


Figura 26: Curvas de dose-resposta para Anoplin-NH₂ (■) e Anoplin-OH (●) após 15 minutos de contato, em função da concentração de peptídeo, em vesículas PCPG 7030 a 90 µM.

5.6 Decoralin (DEC)

É um peptídeo de onze resíduos, que ocorre naturalmente na forma não amidada e é o principal componente peptídico extraído do veneno da vespa solitária *Oreumenes decoratus*; possui atividade antimicrobiana e de desgranulação de mastócitos, mas não é hemolítico. Sua seqüência primária apresenta alta homologia em relação a Anoplin, praticamente conservando a seqüência dos últimos seis resíduos de aminoácidos na região do terminal-C (Tabela 1). A amidação deste produz o análogo Decoralin-NH₂ (DEC-NH₂) com atividade antimicrobiana aumentada e sem atividade hemolítica. Esses dados ainda não foram submetidos à publicação e foram gentilmente cedidos pelo Dr. K. Konno do Instituto Butantan (CAT-CEPID).

Análise Conformacional por Dicroísmo Circular

As figuras 27a, 27b e 28 apresentam os espectros de CD de ambos peptídeos, adquiridos a 8,5 μ M. Em água e em tampão Tris, pH 7,5 eles indicam estruturas desordenadas. Os ambientes anisotrópicos como soluções de TFE, micelas de SDS e vesículas aniônicas de PCPG 7030 induziram em ambos peptídeos duas bandas dicróicas negativas a 208 e 222 nm características de estrutura helicoidal. Porém, em vesículas PC o espectro de ambos peptídeos se diferenciam: DEC-NH₂ apresenta as mesmas bandas, mas com intensidade reduzida e o espectro de DEC é característico de estrutura aleatória.

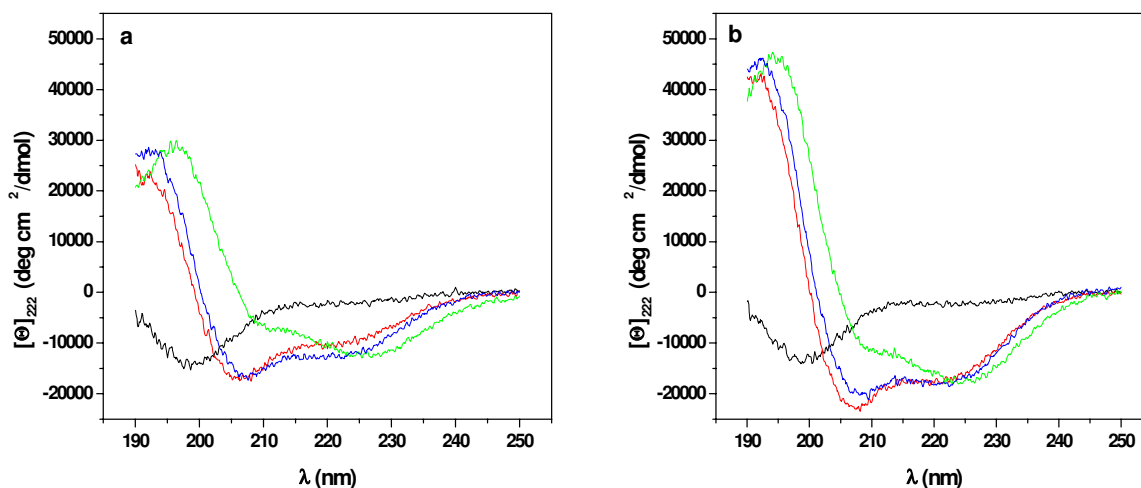


Figura 27: Espectros de CD de Decoralin (a) e de Decoralin-NH₂ (b) a 8.5 μ M, em (—) água, (—) TFE 40%, (—) SDS 165 μ M, (—) SDS 8 mM.

A titulação de soluções de DEC-NH₂ na faixa de 0,1 a 30 μ M com solução de SDS 8 mM mostrou a existência de um ponto isodicroico ao redor de 203 nm (Figura 29a). Isto é indicativo de que o peptídeo existe nesse meio em apenas dois estados, um helicoidal e o outro desordenado (Gans et al., 1991; Scholtz

et al., 1991). A independência entre elipticidade molar ($[\Theta]_{222}$) em água e em SDS 8 mM (Figura 29b) em relação à concentração de peptídeo indica que nessas condições ele apresenta-se na forma monomérica.

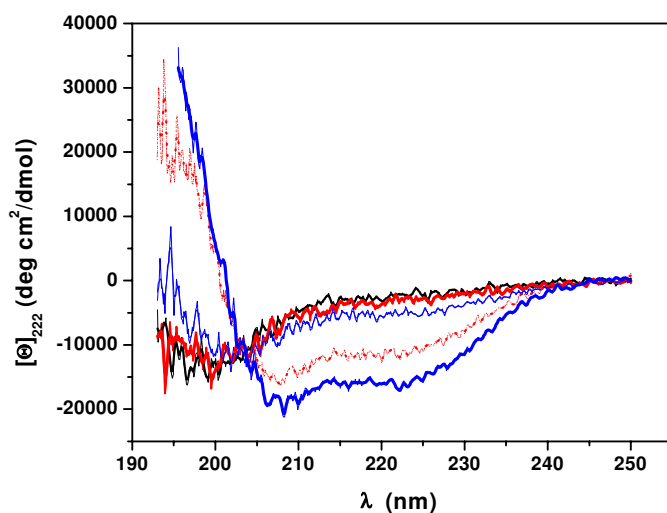


Figura 28: Espectros de CD de Decoralin e Decoralin-NH₂ a 8,5 μ M, 25°C, em tampão (—) e na presença de 63 μ M PC para DEC (—) e DEC-NH₂ (—) e de 26 μ M PCPG 7030 para DEC (....) e DEC-NH₂ (—).

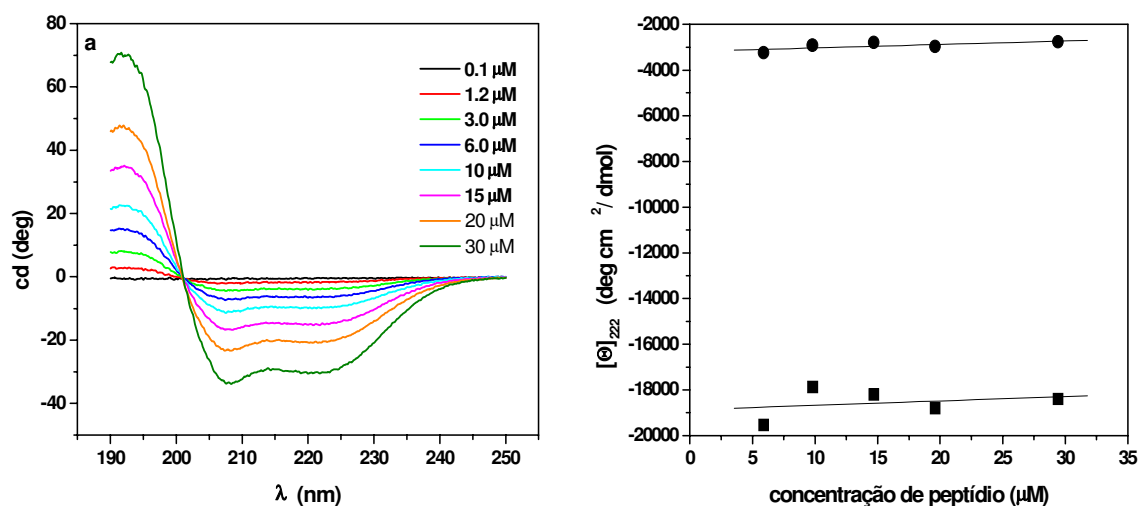


Figura 29: (a) Espectros de CD de DEC-NH₂ obtidos variando-se a concentração de peptídeo entre 0,1 e 30 μ M e mostrando o ponto isodicroico em 203 nm. (b) Gráfico da elipticidade molar ($[\Theta]_{222}$) em água (●) e em SDS 8 mM (■) em função da concentração, indicativo de que nessa faixa o peptídeo apresenta-se monomérico.

Os valores das frações de hélice- α (f_H) estimados para DEC e DEC-NH₂ nas diferentes condições testadas estão apresentados na Tabela 10, em comparação a outros peptídeos de cadeia curta como ANP-NH₂, ANP-OH, EMP-AF2 e EMP-AF3. Independentemente do ambiente considerado, DEC apresenta teores helicoidais significativamente maiores que os demais peptídeos. Para cada peptídeo este teor depende do ambiente, e também da propensidade helicoidal individual dos resíduos. A maioria das escalas de propensidade conhecidas, em TFE (Rohl & Baldwin, 1998), SDS micelar (Blondelle et al., 1997) e vesículas aniônicas (Deber & Li, 1995), indica que todos os resíduos que compõem DEC, assim como os demais peptídeos curtos, apresentam propensidade helicoidal aumentada nesses ambientes. Assim, o maior teor helicoidal observado nesses meios, em relação ao tampão ou à água, poderia ser atribuído ao aumento da propensidade helicoidal de cada resíduo e o mesmo aumento poderia ser esperado em condições fisiológicas.

Tabela 10. Comparativo da fração de hélice α (f_H) de Decoralin e seu análogo, a 8,5 μ M, com outros peptídeos curtos a 10 μ M, em diferentes condições.

	f_H			
	TFE ¹	SDS ²	PCPG ³	PC ⁴
DEC	0,385	0,500	0,453	rc
DEC-NH ₂	0,593	0,650	0,570	0,154
ANP-NH ₂	0,237	0,259	0,212	rc
ANP-OH	0,113	0,247	-	-
EMP-AF2	0,143	0,097	0,136	rc
EMP-AF3	0,131	0,097	rc	rc

¹ 40% TFE; ² > 8.0 mM SDS; ³P/L ratio = 1:2.6; ⁴P/L ratio = 1:6.3.

No entanto, outros fatores devem ser também considerados. Primeiro, os efeitos atribuídos aos terminais-N e -C, que seriam negligenciáveis em longos polipeptídeos, afetam substancialmente os peptídeos menores (Scholtz et al., 1991). Este aspecto é mostrado na Tabela 10: a contribuição do terminal-C amidado na estabilização da estrutura helicoidal. Também se observou nos estudos por RMN com EMP-AF (Sforça et al., 2004) que a amidação do terminal-C forneceu uma ponte de hidrogênio adicional entre o grupo amida e a carbonila da Leu 10, estabilizando a estrutura helicoidal. O aumento da fração helicoidal observado em DEC-NH₂ em relação à forma carboxilada, em TFE, SDS e vesículas PCPG parece ser consistente com um efeito semelhante na estabilidade.

Segundo, o macrodipolo da hélice: em EMP-AF2 e -AF3, há um resíduo Lys na posição 2, próximo ao polo positivo do macrodipolo da hélice que contribui com um efeito de desestabilização da hélice (Hol et al., 1978; Creighton, 1993; Shoemaker et al., 1985), enquanto nos Decoralins há um resíduo polar, não carregado, Ser, na posição 1 favorecendo a estabilidade da hélice. De acordo com Deber & Li (1995), estudos por RMN revelaram que Ser, um resíduo com efeito promotor de hélice junto ao terminal-N (Rohl & Baldwin, 1998), estabiliza a conformação helicoidal de um peptídeo modelo por formar uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de um resíduo Glu, situado três posições à frente na direção do terminal C. Um efeito semelhante é possível em Decs entre o resíduo Ser na posição inicial do terminal N e o outro resíduo Ser da posição 4.

Terceiro, a posição relativa dos resíduos ao longo da seqüência, especialmente Ser e Thr, cujos grupos hidroxila nas cadeias laterais também estão disponíveis para ligações de hidrogênio; observando-se a projeção helicoidal de Dec (Figura 31), esses resíduos estariam na face hidrofílica, assim como os resíduos positivamente carregados Lys e Arg., favorecendo a estrutura anfipática do peptídeo e resultando numa face polar com ângulo relativamente pequeno. O ângulo polar em ANP em meio não carregado como TFE/água foi estimado por simulações de DM como sendo da ordem de 160° , praticamente o mesmo observado na projeção da hélice ideal. A figura 30 indica que a hélice ideal de DEC poderia formar um ângulo polar menor, da ordem de 100° .

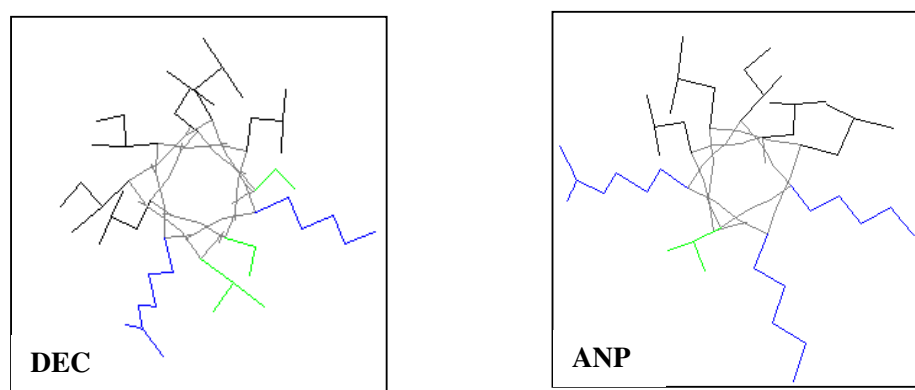


Figura 30: Projeções helicoidais dos peptídeos DEC e ANP mostrando suas possíveis estruturas anfipáticas e ângulos polares.

Para os Decoralins, cuja seqüência primária conta com 5 resíduos carregados ou polares, a maior proporção de resíduos hidrofílicos entre os peptídeos estudados, o ambiente aniônico, de SDS ou vesículas PCPG 7030, favorece a conformação em hélice- α , sugerindo que as interações eletrostáticas são importantes na estabilização da estrutura secundária. Entretanto, observou-se que a fração helicoidal de DEC-NH₂ em vesículas PC aumenta significativamente atingindo cerca de 43% em altas concentrações de lipídeo (P/L=1:96), enquanto DEC e ANPs apresentam espectros característicos de estruturas aleatórias até a relação P/L ao redor de 1:30. Este fato sugere que dentre os efeitos da amidacão do terminal-C de DEC

há também uma redução de seletividade. Efeito semelhante da amidação foi observado com EMP-AF e EMP-AF1 (Figura 5) e indicam a limitada ligação desses peptídeos às vesículas zwitteriônicas.

Embora exista alta homologia entre as seqüências primárias desses peptídeos de cadeia curta, parece não haver correlação entre o número de cargas ou o comprimento da cadeia com o teor de hélice- α . O fato de que em vesículas zwitteriônicas esses peptídeos, exceto DEC-NH₂, apresentem-se desestruturados correlaciona-se bem com a ausência de atividade hemolítica. Da mesma forma, o maior teor helicoidal de DEC-NH₂ em relação a ANP-NH₂ e EMP-AF2 também correlaciona-se bem com sua maior eficiência antimicrobiana.

Análise da atividade lítica

A permeabilização de membranas induzida pelos dois análogos, DEC e DEC-NH₂ foi investigada em experimentos de liberação de CF a partir de vesículas zwitteriônicas PC e aniônicas com as seguintes composições: PCPG 7030, PCPG 4060, PCCL 7030 e PCCL 4060 como mostra a Figura 31. Verifica-se também para estes peptídeos de cadeia curta que existe uma dependência sigmoide da atividade lítica em função da concentração de peptídeo. Isto indica um processo cooperativo e sugere a existência de uma concentração crítica de peptídeo na superfície da vesícula, necessária para induzir o vazamento. Comportamento semelhante foi observado para outros mastoparanos (Matsuzaki et al., 1996a) e melitina (Yang et al., 2001), assim como comportamentos pouco líticos foram observados para ANPs e EMP-AF2 e -AF3.

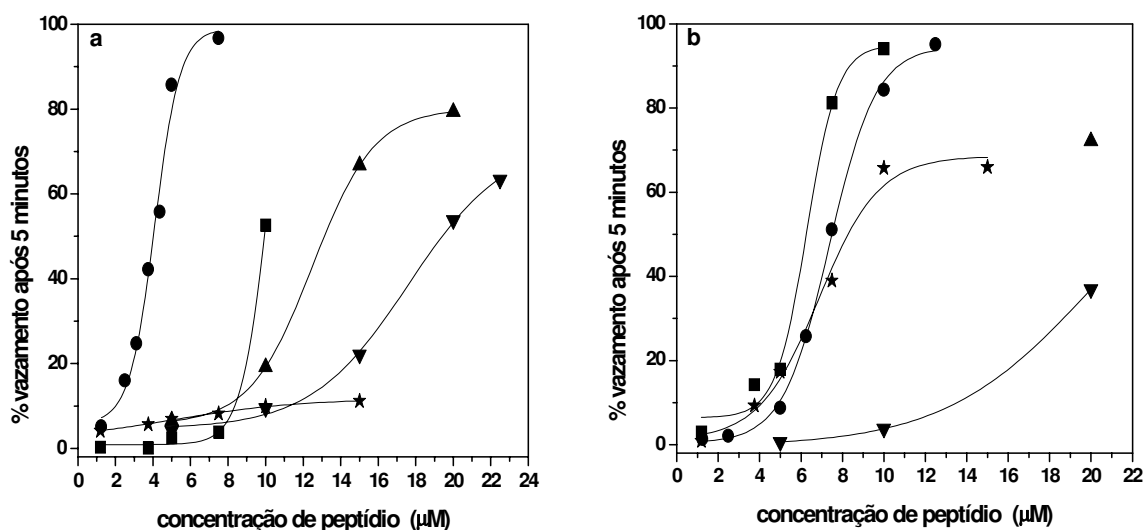


Figura 31: Curvas de dose-resposta para (a) Decoralin (b) Decoralin-NH₂ em vesículas (■) PCPG 7030 90 μM, (●) PCPG 4060 117 μM, (▲) PCCL 7030 250 μM, (▼) PCCL 4060 150 μM e (★) PC 150 μM (10 minutos).

Decoralins são bastante eficientes em baixas concentrações, sendo que a forma carboxilada é mais seletiva para vesículas aniônicas mais densamente carregadas; em vesículas PC e PCPG 7030, DEC é significativamente menos eficiente que DEC-NH₂, porém em vesículas com maior densidade de carga negativa esta situação se inverte. Esta mesma tendência foi observada com os peptídeos ANP-NH₂ e ANP-OH em relação às vesículas PCPG7030 e PCPG4060. A eficiência desses peptídeos em induzir vazamento é também fortemente dependente da composição das vesículas: naquelas onde o fosfolípido aniônico PG foi substituído por CL a concentração limite para induzir vazamento tende a aumentar.

A Figura 32 mostra valores da constante de tempo, τ , resultado do ajuste das isotermas de vazamento, pela equação 7, em vesículas aniônicas para ambos peptídeos e em vesículas zwitteriônicas apenas para DEC-NH₂, pois DEC é pouco lítico para esse tipo de vesícula. Quando o ajuste das isotermas foi possível para diferentes razões P/L de um mesmo tipo de vesícula, os valores de τ , que são ligados à taxa de formação de poros, mostraram-se mais sensíveis ao aumento da razão P/L do que o $\%V_{\max}$, semelhantemente ao já descrito para EMP-AF e para a série EM1~4. Ambos DEC's interagem preferencialmente com as vesículas PCPG4060 e PCCL7030, cujas densidades de carga negativa são semelhantes. Novamente, considerando que a menor razão P/L associada ao menor valor de τ , indica a maior eficiência de um peptídeo em permeabilizar um certo tipo de vesícula, observa-se na Figura 32 que DEC é quase tão eficiente em vesículas PCPG4060 como em PCCL 7030, apesar de CL induzir curvatura negativa em bicamadas lipídicas (Allende et al., 2005), enquanto a forma amidada é um pouco mais eficiente na vesícula que contém PG.

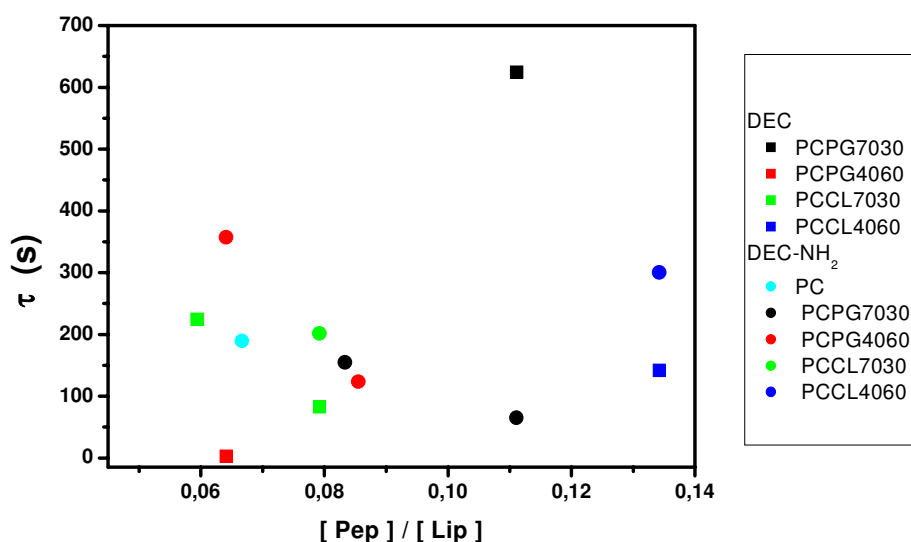


Figura 32: Gráfico da constante de tempo (τ) observada nos vazamentos induzidos por DEC (■) e DEC-NH₂ (●), em vesículas PCPG 7030 (preto), PCPG4060 (vermelho), PCCL7030 (verde), PCCL4060 (azul) e PC (azul claro) e, símbolos cheios em função da concentração P/L mínima em que as respectivas curvas da cinética foram ajustadas.

A eficiência de permeabilização de vesículas aniônicas não está tão bem correlacionada às suas atividades antimicrobianas, já que a forma amidada é bastante mais eficiente do que a forma nativa.

Comparativamente ao que ocorre com EMP-AF2, -AF3, ANP-NH₂ e ANP-OH, que induzem menos de 10% de vazamento após 30 minutos de contato em condições semelhantes, ambas formas de DEC induzem rápido e extenso vazamento em vesículas PCPG7030, como mostra a Figura 33. Em vesículas PCPG4060, DEC apresenta maior vazamento, com a metade da concentração e DEC-NH₂ apresenta praticamente o mesmo vazamento percentual; ambos ANPs, mas especialmente a forma carboxilada, também apresentam maior vazamento neste tipo de vesícula, ou seja as formas carboxiladas de ANP e DEC apresentam maior seletividade pelas vesículas mais densamente carregadas do que os análogos amidados. Dentre os peptídeos de cadeia curta estudados DEC's são os que apresentam maior atividade lítica, comparável a peptídeos de cadeia mais longa, como EMP-AF, Eumenitin e MP1. A amidagem do terminal-C, tornou DEC menos seletivo, embora mais eficiente como peptídeo antimicrobiano.

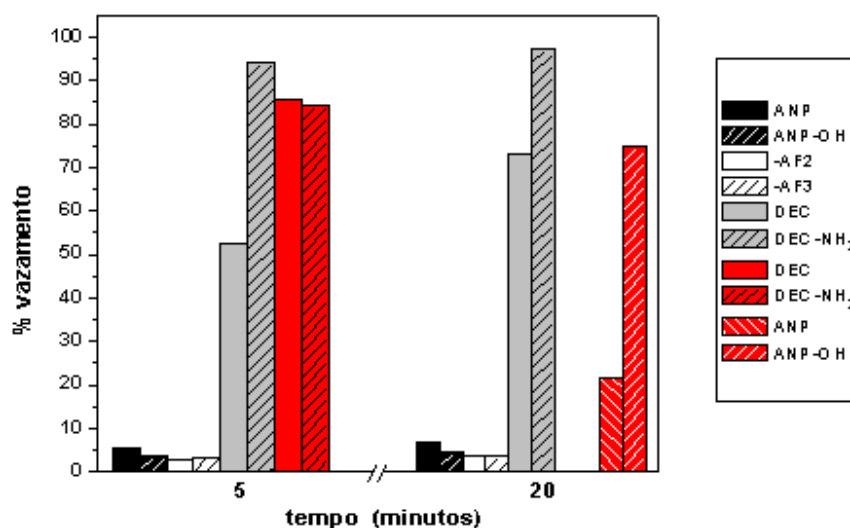


Figura 33: Comparativo de vazamento induzido por peptídeos de cadeia curta em vesículas PCPG 7030, 90 μM , após 5 e após 20 minutos de contato. ANPs na concentração de 15 μM e os demais a 10 μM . Em vermelho, vesículas PCPG4060 120 μM , 5 minutos de contato para DEC 5 μM (liso) e DEC-NH₂ 10 μM (hachurado em preto) e 20 minutos de contato para ANP e ANP-OH (hachurados em branco), ambos a 20 μM .

O alto grau de homologia entre as seqüências desses três peptídeos de cadeia curta, DEC, ANP e EMP-AF2 contrasta com o conjunto das respectivas atividades lítica e biológica tão diferentes. Isso sugere que a posição e/ou a proporção relativa entre resíduos apolares e polares seja um fator importante (Kiyota et al., 1996; Deber & Li, 1995), além da carga líquida, e mais do que a hidrofobicidade média. Giangaspero et al. (2001) e Tossi et al. (2000) propuseram um padrão seqüencial para peptídeos

antimicrobianos lineares, baseado em observações de centenas de seqüências estudadas, onde os resíduos indicados como H são hidrofóbicos, + são positivos, - são negativos, np são polares neutros, e X quando nenhum tipo de resíduo predomina na posição:

Gly - H - H - \pm /np - +/np - H - X/Gly - \pm /np - X - H - \pm /np - +/np - H - H/Gly - +/np - + - H - X -

A seqüência primária de DECs e ANPs (Tabela 1) acompanha esse padrão, enquanto a seqüência de EMP-AF2 se afasta do modelo, o que condiz com o fato deste peptídeo não ser antimicrobiano. O baixo teor helicoidal de EMP-AF2 e -AF3 em todos os ambientes testados deve ser principalmente atribuído à desestabilização do macrodipolo da hélice causada pela distribuição das cargas.

Os três peptídeos apresentaram espectros de CD característicos da conformação helicoidal, em maior ou menor grau, dependendo do ambiente mimético testado. Nestes as formas amidadas dos três peptídeos apresentaram maior teor helioidal do que as respectivas formas carboxiladas, estando a elipticidade bem correlacionada à atividade antimicrobiana. A eficiência de permeabilização de vesículas aniônicas e zwitteriônicas pelos Decoralins também apresenta-se diretamente correlacionada ao teor helicoidal nessas vesículas. Assim, modificações na atividade lítica e na seletividade causadas pela amidação de DEC podem ser atribuídas a variações na afinidade com a bicamada.

5.7 Comentários Gerais

A análise das características conformacionais e da atividade lítica dos peptídeos deste estudo em função de seus parâmetros físico-químicos indica algumas tendências importantes. A Tabela 11 resume as características analisadas desses peptídeos e daqueles freqüentemente citados como referência; as Figuras 34a, b e c mostram as correlações encontradas entre esses parâmetros físico-químicos.

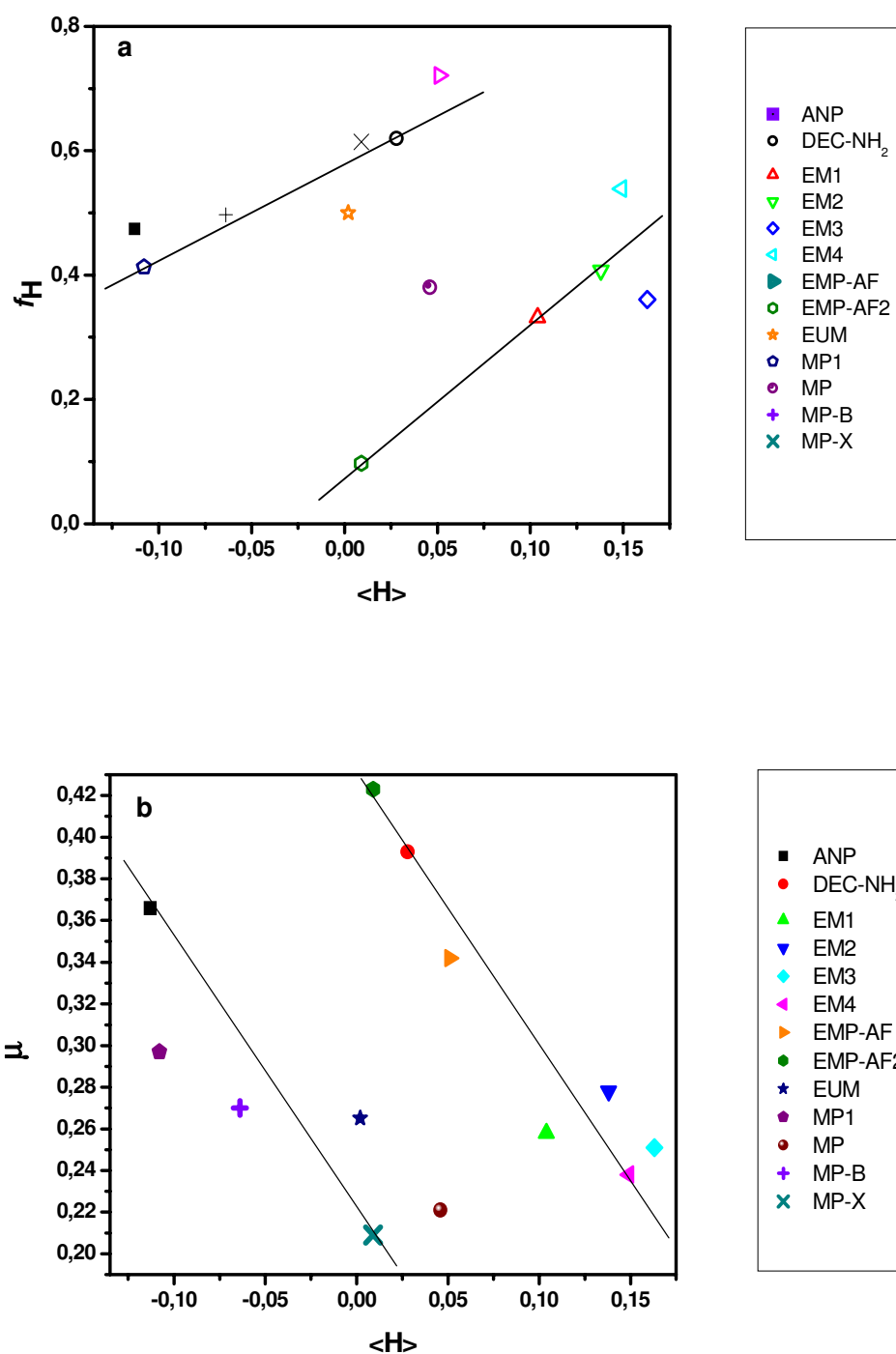
Tabela 11. Características estruturais e atividade biológica dos peptídeos. N, Q, <H>, μ , Φ , f_H , RMN /MD, Hem., Gram+, Gram- e Refs. correspondem, respectivamente, a número de resíduos, carga líquida, hidrofobicidade média, momento hidrofóbico, ângulo polar pela hélice ideal, fração de hélice- α determinada em SDS 8 mM, disponibilidade de dados estruturais por RMN ou Dinâmica Molecular, atividade hemolítica, atividade antimicrobiana (μ M) contra bactérias Gram+ (*S. aureus* ATCC 6538) e contra Gram- (*E. coli* ATCC 25922) e respectivas referências.

Peptídeos	N	Q	<H>	μ	Φ	f_H	RMN / DM	Hem.	Gram+	Gram -	Refs.
Anoplin	10	+4	-0,113	0,366	166°	0,474	sim	não	43,4	17,4	1
Anoplin-OH	10	+3	-0,113	0,366		0,417	sim	não	>88	>88	
Decoralin	11	+2	0,028	0,393	114°	0,510		não	40,4	80,7	
Decoralin-NH ₂	11	+3	0,028	0,393		0,620		não	3,99	7,97	
EM-1	14	+4	0,104	0,258	122°	0,332		não	34	6,8	
EM-2	14	+4	0,138	0,278	120°	0,407		não	17	3,4	
EM-3	14	+2	0,163	0,251	117°	0,361		não	>67	>67	
EM-4	14	+2	0,149	0,238	116°	0,539		não	>67	>67	
EMP-AF	14	+4	0,051	0,342	67°	0,721	sim	sim	3,3	33	2
EMP-AF1	14	+3	0,051	0,342		0,293	sim	não	66,4	16,6	2
EMP-AF2	11	+4	0,009	0,423		0,097		não	>85	>85	2
EMP-AF3	11	+3	0,009	0,423		0,065		não	>86	>86	2
Eumenitin-OH	15	+3	0,002	0,265	143°	0,500		não	>60	6	3
MP-I	14	+2	-0,108	0,297	90°	0,413	DM	não	9,1	4,8	4
MP	14	+4	0,046	0,221	100°	0,380	sim	sim	nd	nd	
MP-B	14	+5	-0,064	0,270	180°	0,497*	sim	sim	nd	nd	
MP-X	14	+4	0,009	0,209	90°	0,614*	sim	sim	nd	nd	

nd = não disponível; *em TFE 40% e 70% respectivamente; em negrito valores obtidos a partir de dados de DM (Broggio Costa, S. T., 2006); Refs. (1) Konno, K. et al., 2001; (2) dos Santos Cabrera et al., 2004; (3) vide Apêndice 8.2; (4) Souza et al., 2005.

A Figura 34a mostra uma limitada correlação entre o teor helicoidal e a hidrofobicidade média dos peptídeos amidados, se excluirmos do grupo o EMP-AF2 e os EMP-EM1~4. Nesses peptídeos a posição 2 é ocupada por um resíduo carregado, positivo em EMP-AF2 e em EM1 e EM2, próximos do polo positivo do macrodipolo da hélice. Nos peptídeos EM1~4 há ainda dois resíduos Gly, limitando a porção central da

cadeia peptídica. Essas características reconhecidamente interferem na elipticidade. Em TFE 40% se observou a mesma tendência, com a mesma discrepância, porém para um teor helicoidal inferior de todos os peptídeos analisados. Segundo Deber & Li (1995), o fato de se encontrarem as mesmas relações entre teor helicoidal e hidrofobicidade em sistemas zwitteriônicos e aniônicos enfatiza a importância das interações hidrofóbicas entre peptídeos e ambiente dirigindo a formação da hélice.



A Figura 34b mostra uma correlação inversa entre o momento hidrofóbico e a hidrofobicidade média dos peptídeos amidados. Essa mesma tendência de redução de μ em função do aumento de $\langle H \rangle$ é encontrada no gráfico de momento hidrofóbico de proteínas de membrana e de superfície, proposto por Eisenberg et al. (1984).

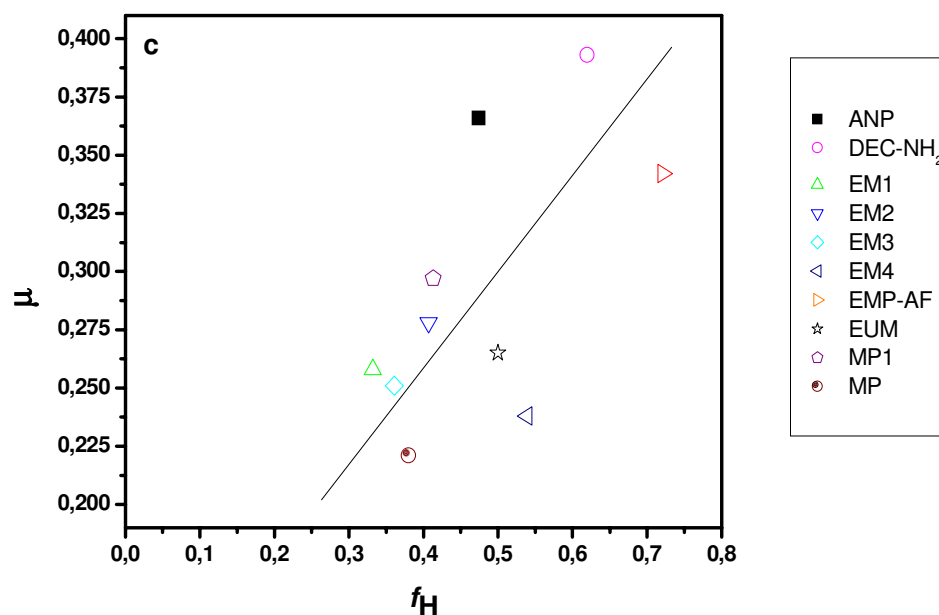


Figura 34: (a) Gráfico da relação entre hidrofobicidade média e elipticidade em meio SDS 8 mM. (b) Gráfico da relação entre hidrofobicidade média e momento hidrofóbico. (c) Gráfico da relação entre elipticidade em meio SDS 8 mM e momento hidrofóbico. Obs.: Os dados de elipticidade de MP-B e MP-X foram obtidos em misturas TFE/água.

A Figura 34c mostra a correlação entre momento hidrofóbico, uma medida da anfipaticidade do peptídeo, e a fração helicoidal em SDS micelar; foram excluídos os peptídeos MP-B e MP-X para os quais não dispomos da elipticidade nesse meio.

O ângulo polar dos peptídeos deste estudo foi estimado com base nas projeções das respectivas hélices ideais, assumindo que 100% das cadeias laterais projetam-se perpendicularmente ao eixo da hélice em intervalos regulares de 100° . Os valores em negrito na Tabela 11 foram obtidos em simulações por Dinâmica Molecular em meio TFE 30% e em alguns casos são próximos daqueles obtidos pela projeção da hélice ideal (Broggio Costa, 2006). No entanto, comparações entre ângulos polares de um mesmo peptídeo (Anoplin) obtido em diferentes ambientes, tais como TFE 30% e SDS micelar, mostraram que a interação das cargas positivas do peptídeo com as cabeças polares negativas de SDS podem causar reduções significativas na dimensão da face polar.

O ajuste de várias curvas da cinética de vazamento de vesículas por um mesmo peptídeo mostrou que τ é inversamente dependente da relação P/L, como mostra, por exemplo a Figura 15. A Figura 35 compara as constantes de tempo dos peptídeos, cujas cinéticas de vazamento foram ajustadas ao modelo monoexponencial descrito pela equação 7, em função da razão molar entre as concentrações de peptídeo e lipídeo PCPG7030 em que a curva da cinética foi obtida. Esse gráfico indica a eficiência relativa desses peptídeos em induzir o vazamento nesse tipo de vesícula e correlaciona-se bem com os dados de atividade antimicrobiana da Tabela 11. Peptídeos que não apresentam ação antimicrobiana apresentam maiores relações P/L.

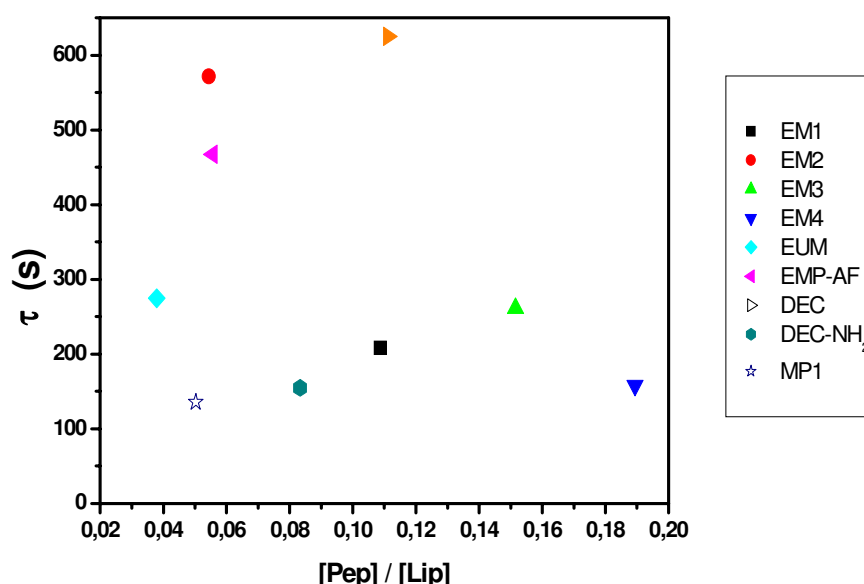


Figura 35: Gráfico da constante de tempo (τ) observada nos vazamentos induzidos pelos peptídeos líticos em vesículas aniônicas, PCPG 7030, em função da concentração P/L mínima em que as respectivas curvas da cinética foram ajustadas.

As Figuras 36a a f correlacionam as características físico-químicas e a atividade antimicrobiana à constante de tempo (τ) multiplicada pela relação P/L em que a mesma constante foi obtida.

As correlações entre $\tau \times P/L$ e hidrofobicidade ($\langle H \rangle$) e entre $\tau \times P/L$ e elipticidade (f_H) são diretas (Figuras 36a e c), assim como já encontrado para $f_H \times \langle H \rangle$ (Figura 34a). Novamente o conjunto dos peptídeos EM1~4 não se correlacionam bem quando o parâmetro analisado é a elipticidade. O parâmetro μ correlaciona-se inversamente com $\tau \times P/L$ (Figura 36b), da mesma forma como encontrado para $\mu \times \langle H \rangle$ (Figura 34b). A Figura 36d sugere uma limitada correlação inversa entre o ângulo da face polar (ϕ) e $\tau \times P/L$; entretanto, a literatura indica que quanto menor ϕ , maior a eficiência em permeabilizar vesículas

aniônicas (Dathe et al., 2002; Wieprecht et al., 1997b). Além disso, dados de RMN de Anoplin e simulações de DM (dos Santos Cabrera et al., 2006, dados não publicados, vide Apêndice 8.3) mostraram que o ângulo polar é dependente das interações eletrostáticas do peptídeo com o meio; por isso, sugerimos que as correlações com o ângulo polar só possam ser adequadamente analisadas se baseadas em dados estruturais como aqueles de RMN ou DM.

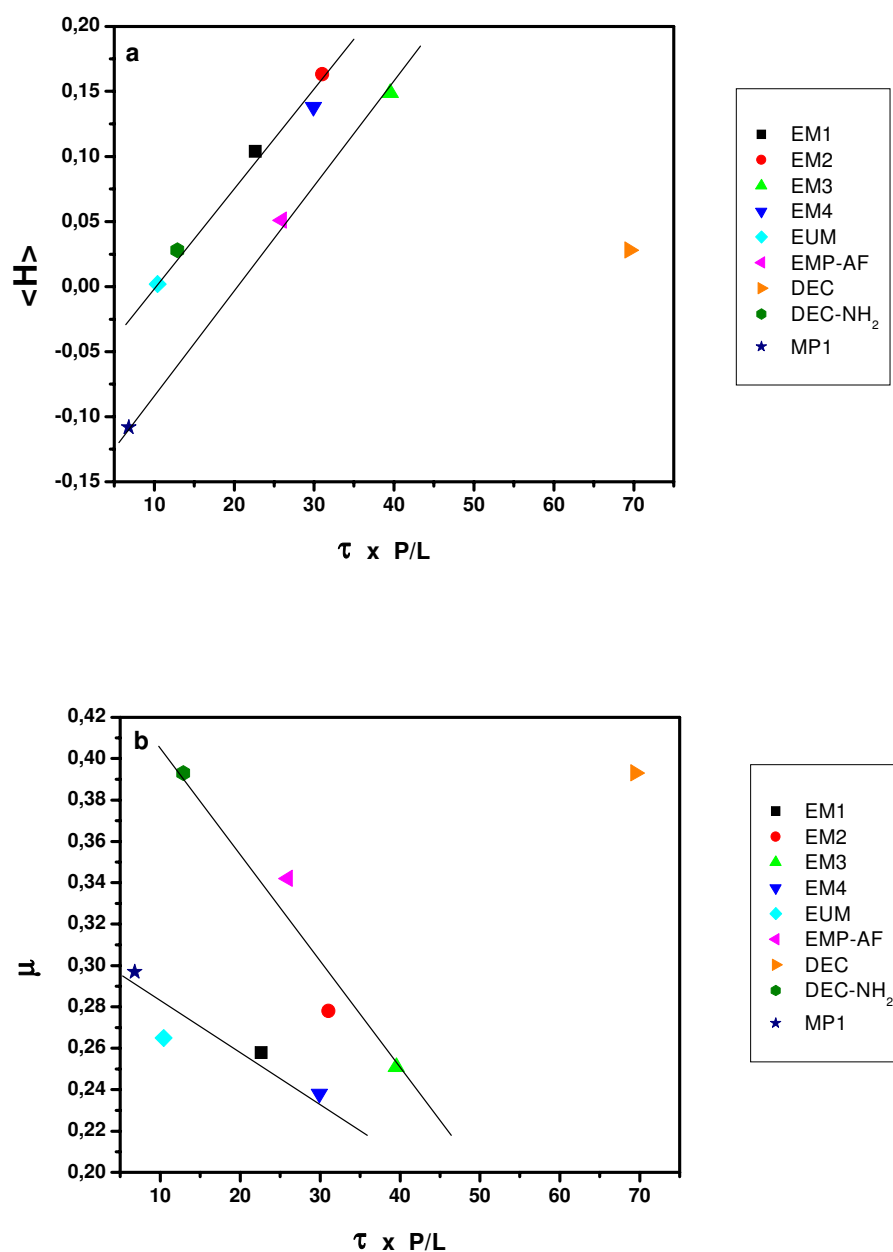


Figura 36: (a) Gráfico da correlação entre hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$) dos peptídeos (dados da Tabela 11) e o produto $\tau \times P/L$. (b) idem entre momento hidrofóbico (μ) e $\tau \times P/L$.

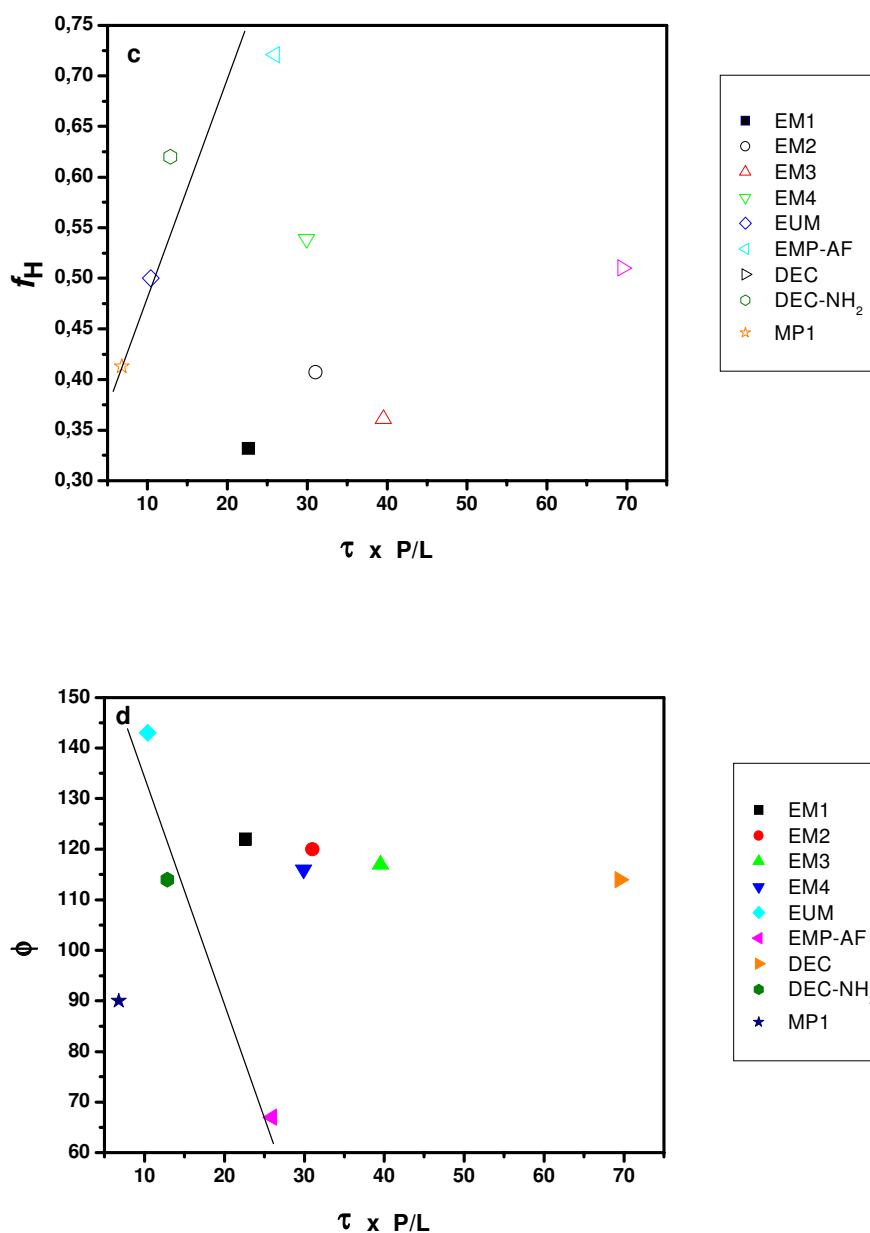


Figura 36: (c) Gráfico da correlação entre fração de hélice- α (f_H) dos peptídeos (dados da Tabela 11) e o produto $\tau \times P/L$. (d) idem entre ângulo da face polar (ϕ) e $\tau \times P/L$.

As Figuras 36e e f apresentam as correlações obtidas entre as MIC para bactérias Gram-positivas (símbolos cheios) e Gram-negativas (símbolos vazados), conforme os dados da Tabela 11, e $\tau \times P/L$ ou μ , respectivamente. Com exceção de EMP-AF e Decoralins, todos os peptídeos deste estudo apresentam seletividade para bactérias Gram-negativas, porém os peptídeos MP1 e EM2, praticamente não apresentam essa seletividade; observa-se que os menores valores de MIC correspondem também aos menores valores de $\tau \times P/L$.

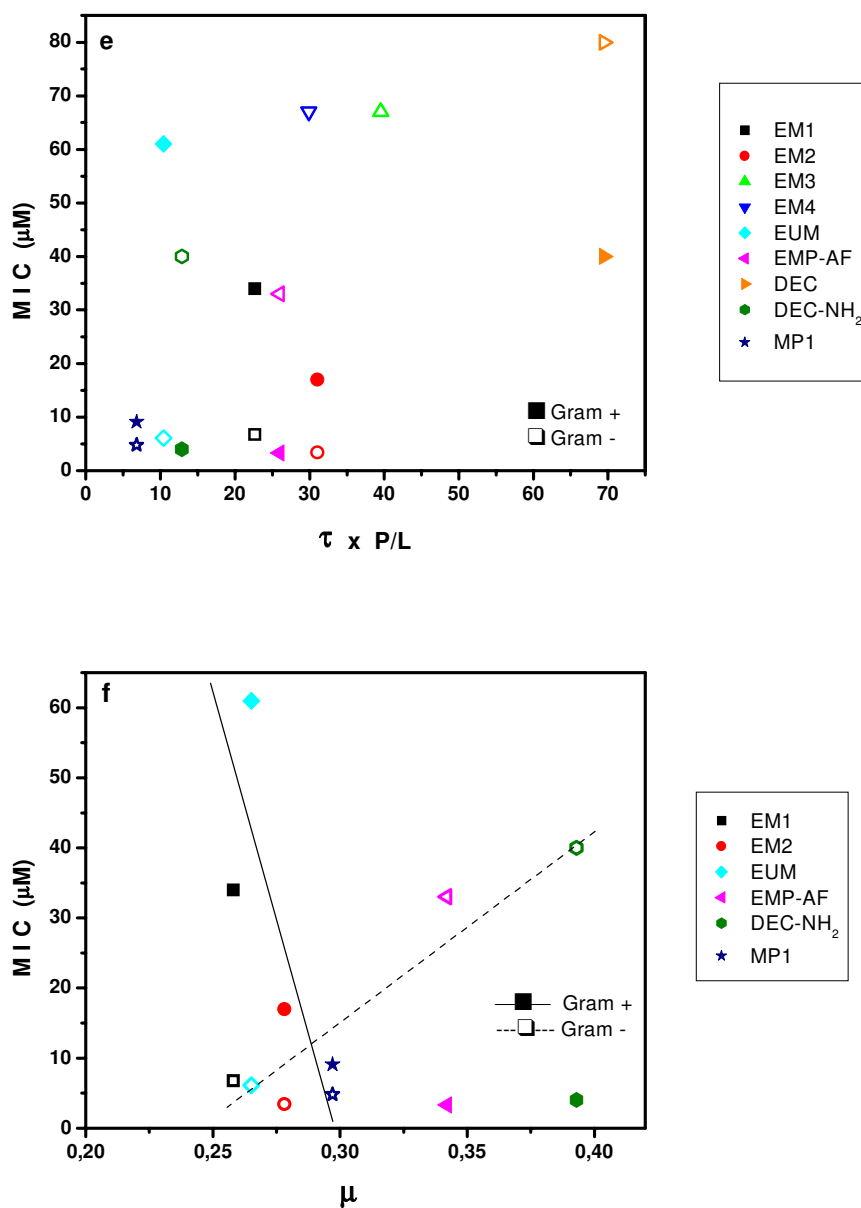


Figura 36: (e) Gráfico da correlação entre a concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos para bactérias Gram-positivas (símbolos cheios) e Gram-negativas (símbolos vazados), a partir dos dados da Tabela 11, e o produto $\tau \times P/L$. (f) idem entre ângulo da face polar (ϕ) e o momento hidrofóbico (μ).

A Figura 36f sugere que a correlação entre MIC e o momento hidrofóbico, μ , seja direta ou inversa dependendo se a bactéria seja Gram-positiva ou Gram-negativa, respectivamente. Os peptídeos pouco seletivos, MP1 e EM2, situam-se, no gráfico, na região do cruzamento dessas duas tendências. Comparando esta figura à Figura 35, observa-se que os peptídeos com ação antimicrobiana mais eficiente pelos dados da Tabela 10, são também aqueles em que τ corresponde aos menores valores da razão P/L .

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS e CONCLUSÕES

6.1 Atividade lítica dos peptídeos antimicrobianos

Experimentos de vazamento de vesículas revelaram que os peptídeos com ação antimicrobiana EMP-AF, Eumenitin, EM1, EM2, MP1 e Decoralins apresentam intensa atividade em membranas modelo. Anoplin é exceção, um peptídeo antimicrobiano, pouco lítico apenas em concentrações relativamente altas, em vesículas zwitteriônicas e aniônicas de diferentes composições. EM3 e EM4 também são exceções, pois são bastante ativos, mas desprovidos de ação antibacteriana. Apenas EMP-AF apresenta alguma atividade hemolítica, mesmo assim todos, exceto Anoplin e DEC, causam expressivo vazamento em vesículas zwitteriônicas PC. Apesar disso, todos eles interagem preferencialmente com bicamadas aniônicas, em consequência de sua carga líquida positiva (Matsuzaki et al., 1995a; Matsuzaki, 1998a). As menores razões limite P/L e as menores constantes de tempo, τ , obtidas nos experimentos de vazamento, evidenciam essa seletividade (Tabelas 3 e 6; Figuras 15 e 20b). A constante de tempo, τ , que está ligada à taxa de formação de poros, é inversamente dependente da razão P/L e bastante sensível a pequenas variações desta. Entretanto, a constante $\%V_{max}$, ligada ao número de poros abertos ou à sua condutância, varia bem menos e é menos susceptível às variações da razão P/L. Isso sugere que quanto maior P/L, para um mesmo peptídeo e um mesmo tipo de vesícula, poros semelhantes se formarão mais rapidamente, porém não permanecerão mais tempo abertos do que aqueles formados em menores razões P/L. Entretanto, no caso da melitina, em vesículas PCPG 9010, Matsuzaki et al. (1997b) encontraram que o tamanho do poro depende da razão P/L. Qualitativamente é interessante notar que a atividade lítica acontece de modo cooperativo tanto em vesículas aniônicas como nas zwitteriônicas e, em um processo predominantemente caracterizado pela equação 7, para todos os peptídeos. Outras composições lipídicas aniônicas foram testadas, onde a densidade de carga negativa foi aumentada, ou pelo aumento da proporção de PG ou pela substituição deste por CL. Com exceção de DEC-NH₂, verificou-se que o aumento da carga líquida reduz τ . Entretanto, as vesículas contendo CL tiveram a razão P/L limite aumentada, indicando que as propriedades elásticas das bicamadas também podem definir a seletividade.

Com exceção de Anoplin, todos os peptídeos que apresentam ação antimicrobiana apresentam curvas de dose-resposta que mostram uma dependência sigmoidal com a concentração do peptídeo. Isso sugere que esses peptídeos se acumulam na superfície da vesícula até atingir uma concentração crítica, além da qual o vazamento aumenta cooperativamente. A acumulação de peptídeo para induzir o vazamento é uma característica importante do modelo proposto por Matsuzaki, Shai e Huang (MSH) (Matsuzaki, 1999a; Oren & Shai, 1998; Huang, 2000; Chen et al., 2003) para explicar o mecanismo de ação de peptídeos que formam poros.

De uma forma geral os peptídeos mais eficientes como antimicrobianos, pelos dados da Tabela 11, são também aqueles caracterizados pela maior eficiência em permeabilizar vesículas aniônicas do tipo PCPG 7030 e por baixas razões limite P/L, verificadas nas curvas de dose-resposta, indicando que a ruptura das bicamadas não poderia ser descrita pelo modelo carpete (Oren & Shai, 1998) de formação de poro que se baseia no recobrimento da superfície da vesícula por moléculas de peptídeo. O modelo barril foi comprovado para peptídeos com baixa carga positiva, como a alameticina (Bechinger, 1999) e a gramicidina (Killian, 1992), e cujas cadeias são suficientes para atravessar a bicamada lipídica. Os peptídeos do presente estudo apresentam alta densidade de carga positiva e possuem no máximo 15 resíduos, que mesmo em sua conformação mais estendida não são suficientemente longos. Assim, a atividade lítica dos peptídeos deste estudo provavelmente acontece por um mecanismo semelhante ao descrito no modelo do poro toroidal. A atividade hemolítica de alguns peptídeos tem sido atribuída à interação com o centro hidrofóbico das bicamadas. Os peptídeos deste estudo não são hemolíticos ou apresentam pequena atividade hemolítica, além disso são altamente catiônicos, o que não favorece sua interação direta com as regiões hidrofóbicas. Por esses motivos é possível sugerir que os peptídeos líticos e antimicrobianos estudados interagem preferencialmente com a região das cabeças dos fosfolipídeos, formando poros cuja estrutura mista, lipídeo / peptídeo expõe os resíduos polares e carregados ao solvente aquoso.

6.2 As mudanças conformacionais

Os peptídeos deste estudo são lineares e apresentam conformação aleatória em água e tampão pH 7,5. Enquanto a fase aquosa desestabiliza a estrutura secundária por competir pela formação de ligações de hidrogênio com a cadeia principal, a formação de hélices na interface água/membrana é termodinamicamente favorecida. Em meios anisotrópicos que mimetizam membranas celulares tais como, misturas TFE/água, soluções micelares de SDS e vesículas aniônicas eles estruturam-se em hélice- α . Em vesículas zwitteriônicas, ANP, DEC, EMP-AF1~3 e EUM também apresentam conformações aleatórias; em geral, peptídeos que são menos hidrofóbicos terão maior tendência em particionar na fase aquosa, como indicado pela ausência de estrutura secundária em vesículas PC (Deber & Li, 1995). Porém, outros fatores podem modular essa tendência, pois DEC-NH₂ e MP1 apresentam um pequeno teor helicoidal em vesículas PC. Todos os peptídeos apresentaram maior teor helicoidal em SDS do que em TFE; isto significa que as interações hidrofóbicas determinam a elipticidade, mas esta é modulada pelas interações eletrostáticas proporcionadas pela polaridade do meio. A elipticidade também é influenciada pela relação P/L, sugerindo que a afinidade entre peptídeo e lipídeo também afeta a transição conformacional.

Embora não se observe nenhuma correlação geral entre carga líquida e elipticidade, os peptídeos amidados apresentaram maior teor helicoidal que seus análogos carboxilados, sinalizando a influência

do macrodipolo da hélice. Além disso, não se observa uma correlação geral entre elipticidade e atividade antimicrobiana, embora dentre os peptídeos de cadeia mais curta, com 10 a 11 resíduos, DEC-NH₂, o mais helicoidal, é também o mais ativo. Por outro lado, os peptídeos mais eficientes na permeabilização de vesículas e também como antimicrobianos são aqueles que apresentam hidrofobicidade média negativa ou pouco positiva. Já a influência do momento hidrofóbico é mais evidente na seletividade dos peptídeos em sua ação sobre bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas: peptídeos mais seletivos para bactérias Gram+, são aqueles de maior momento hidrofóbico.

7. REFERÊNCIAS

- ALLENDE, D.; MCINTOSH, T. J. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. **Biochemistry**, v. 42, p. 1101-1108, 2003.
- ALLENDE, D., SIMON, S. A., MCINTOSH, T. J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. **Biophys. J.**, v. 88, p. 1828-1837, 2005.
- ANDREU, D. et al. Shortened Cecropin A-Melittin hybrids - Significant size reduction retains potent antibiotic activity. **FEBS Lett.**, v. 296, p.190-194, 1992.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, p. 415-433, 1998.
- ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A₂ activity by Mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 13697-13702, 1983.
- BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 157-183, 1999.
- BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. **Biochemistry**, v. 31, p. 12688-12694, 1992.
- BLONDELLE, S. E. et al. Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. **Biopolymers**, v. 42, p. 489-498, 1997.
- BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K; AGUILLAR, M. I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 89-108, 1999.
- BRAUNSTEIN, A.; PAPO, N.; SHAI, Y. In Vitro Activity and Potency of an Intravenously Injected Antimicrobial Peptide and its DL Amino Acid Analog in Mice Infected with Bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 3127-3129, 2004.
- BROCHARD-WYART, F.; De GENNES, P. G.; SANDRE, O. Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out. **Physica A**, v. 278, p. 32-51, 2000.
- BROGDEN, K. A. et al. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, p. 465-478, 2003.
- BROGGIO COSTA, S. T. **Estudos conformacionais por Dinâmica Molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos em mistura de TFE-água.** 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.
- CHEN, F. Y.; LEE, M. T.; HUANG, H. W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on Alamethicin. **Biophys. J.**, v. 82, p. 908-914, 2002.
- CHEN, F. Y.; LEE, M. T.; HUANG, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. **Biophys. J.**, v. 84, p. 3751-3758, 2003.
- CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. **Biochemistry**, v. 13, p. 211-222, 1974.
- CHUANG, C. C. et al. Conformation of *Vespa basalis* Mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1292, p. 1-8, 1996.
- CREIGHTON, T. E. **Proteins: structures and molecular properties.** 2nd ed. New York: W. H. Freeman, 1996.

-
- DATHE, M. et al. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. **Biochemistry**, v. 35, p. 12612-12622, 1996.
- DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Lett.**, v. 403, p. 208-212, 1997.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 71-87, 1999.
- DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of Magainin peptides by modification of charge. **FEBS Lett.**, v. 501, p. 146-150, 2001.
- DATHE, M. et al. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1558, p. 171-186, 2002.
- DEBER, C. M.; LI, S. C. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. **Biopolymers**, v. 37, p. 295-318, 1995.
- DeGRADO, W. F. et al. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic Melittin analogue. **Biophys. J.**, v. 37, p. 329-338, 1982.
- DE KROON, A. I.; DE GIER, J.; DE KRUIJFF, B. The effect of a membrane potential on the interaction of mastoparan X, a mitochondrial presequence, and several regulatory peptides with phospholipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1068, p. 111-124, 1991.
- DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Conformation and lytic activity of Eumenine Mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **J. Peptide Res.**, v. 64, p. 95-103, 2004.
- EISENBERG, D. et al. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **J. Mol. Biol.**, v. 179, p. 125-142, 1984.
- ENGELS, W. et al. Dietary modulation of fatty acid composition of mast cell phospholipids does not affect histamine release induced by compound 48/80. **Inflamm. Res.**, v. 46, p. 185-190, 1997.
- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 11-28, 1999.
- GANS, P. J. et al. The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data. **Biopolymers**, v. 31, p. 1605-1614, 1991.
- GHOSH, J. K. et al. Selective cytotoxicity of Dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31609-31616, 1997.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides – A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 5589-5600, 2001.
- HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, p. 418-422, 1997.
- HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 402-410, 2000.
- HARROUN, T. A. et al. Theoretical Analysis of Hydrophobic Matching and Membrane-Mediated Interactions in Lipid Bilayers Containing Gramicidin. **Biophys. J.**, v. 76, p. 3176-, 1999.
- HELLER, W. T. et al. Multiple states of beta-sheet peptide protegrin in lipid bilayers. **Biochemistry**, v. 37, p. 17331-17338, 1998.

-
- HELLER, W. T. et al. Membrane thinning effect of the β -sheet antimicrobial protegrin. **Biochemistry**, v. 39, p. 139-145, 2000.
- HELLMANN, N.; SCHWARZ, G. Peptide-liposome association: a critical examination with Mastoparan X. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1369, p. 267-277, 1998.
- HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation of G_i and G_0 by Mastoparan, related amphiphilic peptides and hydrophobic amines. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 14176-14186, 1990.
- HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespa lewisii*. **Chem Pharm Bull.**, v.27, p. 1942-1944, 1979.
- HOFFMANN, J. A. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313-1318, 1999.
- HOL, W. G. J.; VAN DUIJNEN, P. T.; BERENDSEN, H. J. C. The α -helix dipole and the properties of proteins. **Nature**, v. 273, p. 443-446, 1978.
- HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, p. 8347-8352, 2000.
- HUANG, H. W.; WU, Y. Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. **Biophys. J.**, v. 60, p. 1079-1087, 1991.
- HUANG, H. W.; CHEN, F. Y., LEE, M. T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. **Phys. Rev. Lett.**, v. 92, p. 198304, 2004.
- IFRAH, D. et al. Structure-activity relationship study of anoplin. **J. Peptide Sci.**, v. 11, p. 113-121, 2005.
- ITO, A. S. et al. Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. **Biochemistry**, v. 32, p. 12264-12272, 1993.
- IVANOVA, P. T. et al. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of changes in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation. **PNAS**, v. 98, p. 7152-7157, 2001.
- JOSHI, H. V.; MEIER, M. S. The effect of a peptide helix macrodipole on the pK_a of an Asp side chain carboxylate. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, p. 12038-12044, 1996.
- KATSU, T. et al. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1027, p. 185-190, 1990.
- KILLIAN, J. A. Gramicidin and Gramicidin-lipid interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1113, p. 391-425, 1992.
- KITAMURA, A. et al. Morphological behavior of acidic and neutral liposomes induced by basic amphiphilic α -helical peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance. **Biophys. J.**, v. 76, p. 1457-1468, 1999.
- KIYOTA, T.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Design and synthesis of amphiphilic α -helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. **Biochemistry**, v. 35, p. 13196-13204, 1996.
- KONNO, K. et al. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, v. 38, p. 1505-1515, 2000.
- KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1550, p. 70-80, 2001.
- LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by Melittin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1514, p. 253-260, 2001.

-
- LAZAREV, V. N. et al. Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 536-541, 2004.
- LEE, M. T. et al. Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation. **Biophys. J.**, v. 89, p. 4006-4016, 2005.
- LEHRER, R. I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 23-27, 1999.
- LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids – possible biological relevance. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 988, p. 221-256, 1989.
- LOHNER, K.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 141-156, 1999.
- LUDTKE, S. J. et al. Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1190, p. 181-184, 1994.
- LUDTKE, S.; HE, K.; HUANG, H. Membrane thinning caused by Magainin 2. **Biochemistry**, v. 34, p. 16764-16769, 1995.
- LUM, K.; CHANDLER, D.; WEEKS, J. D. Hydrophobicity at Small and Large Length Scales. **J. Phys. Chem. B**, v. 103, p. 4570-4577, 1999.
- LUO, P.; BALDWIN, R.L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. **Biochemistry**, v.36, p. 8413-8421, 1997.
- LYU, P. C. et al. Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. **Science**, v. 250, p. 669-673, 1990.
- MANGONI, M. L. et al. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 984-990, 2005.
- MARQUSEE, S.; BALDWIN, R. L. Helix Stabilization by Glu--- Lys+ Salt Bridges in Short Peptides of De novo Design. **PNAS**, v. 84, p. 8898-8902, 1987.
- MARQUSEE, S.; ROBBINS, H. V.; BALDWIN, R. L. Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, 5286-5290, 1989.
- MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1376, p. 391-400, 1998a.
- MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense ? Magainins and Tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 1-10, 1999a.
- MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense ? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 598-601, 2001.
- MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative Bacteria. **FEBS Lett.**, v. 449, p. 221-224, 1999b.
- MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MIYAJIMA, K. Pore formation and translocation of Melittin. **Biophys. J.**, v. 73, p. 831-838, 1997b.
- MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, Tachyplesin I, with lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1070, p. 259-264, 1991.

-
- MATSUZAKI, K. et al. Orientational and aggregational states of Magainin 2 in phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v. 33, p. 3342-3349, 1994.
- MATSUZAKI, K. et al. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. **Biochemistry**, v. 34, p. 3423-3429, 1995a.
- MATSUZAKI, K. et al. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, Magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. **Biochemistry**, v. 34, p. 6521-6526, 1995b.
- MATSUZAKI, K. et al. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. **Biochemistry**, v. 35, p. 8450-8456, 1996a.
- MATSUZAKI, K. et al. An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochemistry**, v. 35, p. 11361-11368, 1996b.
- MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1327, p. 119-30, 1997a.
- MATSUZAKI, K. et al. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by Magainin 2. **Biochemistry**, v. 37, p. 11856-11863, 1998b.
- McDOWELL, L.; SANYAL, G. B.; PRENDERGAST, F. G. Probable role of amphiphilicity in the binding of mastoparan to calmodulin. **Biochemistry**, v. 24, p. 2979-2984, 1985.
- MENDES, M. A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 44, p.67-74, 2004.
- MENDES, M. A.; de Souza, B. M.; Palma, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, p.101-106, 2004.
- NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v. 25, p. S115-S121, 1986.
- NORDAHL, E. A. et al. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. **PNAS**, v. 101, p. 16879-16884, 2004.
- O'NEIL, K. T.; DeGRADO, W. F. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. **Science**, v. 250, p. 646-651, 1990.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Selective Lysis of Bacteria but not mammalian cells by diastereomers of Melittin: structure-function study. **Biochemistry**, v. 36, p. 1826-1835, 1997.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, p. 451-463, 1998.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. **Biochemistry**, v. 42, p. 458-466, 2003a.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes ? **Peptides**, v. 24, p. 1693-1703, 2003b.
- PAPO, N.; SHAI, Y. A Molecular Mechanism for Lipopolysaccharide Protection of Gram-negative Bacteria from Antimicrobial Peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 10378-10387, 2005.
- PARK, C. B. et al. Structure-activity analysis of Buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of Buforin II. **PNAS**, v. 97, p. 8245-8250, 2000.
- PARK, N. G. et al. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. **Biopolymers**, v. 36, p. 793-801, 1995.

-
- PATHAK, N. et al. Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity, and α -helicity on the activities of antimicrobial Peptides. **Proteins: Struct., Funct., Genet.** v. 22, p. 182-186, 1995.
- POWERS, J. P. S; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, p. 1681-1691, 2003.
- PUECH, P. H. et al. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge. **Phys. Rev. Lett.**, v. 90, p. 128304, 2003.
- RIBEIRO, S. P. et al. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 25, p. 2069-2078, 2004.
- RISSE, A.; ZANETTI, M.; GENARO, R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. **Cell. Immunol.**, v. 189, p. 107-115, 1998.
- ROHL, C. A.; BALDWIN, R. L. Deciphering rules of helix stability in peptides. **Methods in Enzymol.**, v. 295, p. 1-26, 1998.
- ROMANO-FONTES, L. G. et al. Fatty acid transport across lipid bilayer planar membranes. **Lipids**, v.35, p. 31-34, 2000.
- ROUSER, G.; FLEISHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v. 5, p. 494-496, 1970.
- SANYAL, G. et al. Binding of amphiphilic peptides to a carboxy-terminal tryptic fragment of calmodulin. **Biochemistry**, v. 27, p. 6229-6236, 1988.
- SCHLAME, M; RUA, D.; GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog. Lipid Res.**, v. 39, p. 257-288, 2000.
- SCHOLTZ, J. M. et al. The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide. **Biochemistry**, v. 32, p. 9668-9676, 1993.
- SCHOLTZ, J. M. et al. Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water. **Biopolymers**, v. 31, p. 1463-1470, 1991.
- SCHULZ, G.E.; SCHIRMER, R. H. **Principles of protein structure**. New York: Springer-Verlag, 1979 p. 10-16.
- SCHWARZ, G. A universal thermodynamic approach to analyze biomolecular binding experiments. **Biophysical Chemistry**, v. 86, p. 119-129, 2000.
- SCHWARZ, G.; BLOCHMANN, U. Association of the wasp venom peptide Mastoparan with electrically neutral lipid vesicles – salt effects on partitioning and conformational state. **FEBS Lett.**, v. 318,p. 172-176, 1993.
- SCOTT, M. G.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. W. Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2005-2009, 1999.
- SFORÇA, M. L. et al. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. **Biochemistry**, v. 43, p. 5608-5617, 2004.
- SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **TIBS**, v. 20, p. 460-464, 1995.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 55-70, 1999.
- SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of Dermaseptin S3. **Biochemistry**, v. 41, p. 7312-7317, 2002.
- SHOEMAKER, K. R. et al. Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 2349-2353, 1985.

-
- SILIGARDI, G.; DRAKE, A. F. The importance of extended conformations and, in particular, the P_{II} conformation for the molecular recognition of peptides. **Biopolymers**, v. 37, p. 281-292, 1995.
- SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 29-54, 1999.
- SOUZA, B. M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p.2157-2164, 2005.
- STROP, P.; MARINESCU, A. M.; MAYO, S. L. Structure of a protein G helix variant suggests the importance of helix propensity and helix dipole interactions in protein design. **Protein Sci.**, v. 9, p. 1391-1394, 2000.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4-30, 2000.
- TRIGGIANI, M. et al. Lipid mediators from mast cells and basophils in allergic diseases. In: **Mast cells and basophils**, Marone, G.; Lichtenstein, L.; Galli, S.; editors. New York: Academic Press, p. 525-539, 2000.
- WADE, D. et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. **PNAS**, v. 87, p. 4761-4765, 1990.
- WAKAMATSU, K. et al. Membrane-bound conformation of Mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. **Biochemistry**, v. 31, p. 5654-5660, 1992.
- WATERHOUS, D. V.; JOHNSON Jr., W. C. Importance of environment in determining secondary structure in proteins. **Biochemistry**, v. 33, p. 2121-2128, 1994.
- WHILES, J. A. et al. Orientation and effects of Mastoparan X on phospholipid bicelles. **Biophys. J.**, v. 80, p. 280-293, 2001.
- WIEPRECHT, T. et al. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochemistry**, v. 36, p. 6124-6132, 1997a.
- WIEPRECHT, T. et al. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. **Biochemistry**, v. 36, p. 12869-12880, 1997b.
- WU, Y.; HE, K.; LUDTKE, S. J., HUANG, H. W. X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides:diphytanoyl phosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations. **Biophys. J.**, v. 68, p. 2361-2369, 1995.
- YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on Melittin pores. **Biophys. J.**, v. 81, p. 1475-1485, 2001.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 27-55, 2003.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.
- ZHANG, L; ROZEK, A; HANCOCK, R. E. W. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 35714-35722, 2001.
- ZHAO, H. X. et al. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model membranes. Comparison of temporin B and temporin L. **Biochemistry**, v. 41, p. 4425-4436, 2002.
- ZHONG, L.; JOHNSON Jr., C. Environment affects amino acid preference for secondary structure. **PNAS**, v. 89, p. 4462-4465, 1992.

M.P. dos Santos Cabrera
B.M. de Souza
R. Fontana
K. Konno
M.S. Palma
W.F. de Azevedo Jr
J. Ruggiero Neto

Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom

Authors' affiliations:

M.P. dos Santos Cabrera, W.F. de Azevedo Jr and J. Ruggiero Neto, Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

B.M. de Souza and M.S. Palma, Centro de Estudos de Insetos Sociais/Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP 13560-000, Brazil; Institute for Immunological Investigations (iii) – CNPq/MCT

R. Fontana, Universidade de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil

K. Konno, M.S. Palma, W.F. de Azevedo Jr and J. Ruggiero Neto, Centro de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

Correspondence to:

J. Ruggiero Neto
Departamento de Física
IBILCE-UNESP
15054-000 São José do Rio Preto (SP)
Brazil
Tel.: 55 17 221 2248
Fax: 55 17 221 2247
E-mail: joao@df.ibilce.unesp.br

Dates:

Received 10 November 2003
Revised 23 December 2003
Accepted 29 April 2004

To cite this article:

dos Santos Cabrera, M.P., de Souza, B.M., Fontana, R., Konno, K., Palma, M.S., de Azevedo Jr, W.F., & Ruggiero Neto, J. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom.

J. Peptide Res., 2004, 64, 95–103.

Copyright Blackwell Munksgaard, 2004

Key words: amphiphilic helix; antimicrobial peptide; eumenine mastoparan; membrane permeation; wasp venom

Abstract: Eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) is a novel membrane active tetradecapeptide recently isolated from the venom of solitary wasp, *Anterhynchium flavomarginatum micado*. It was reported previously that EMP-AF peptide presented low cytolytic activities in human erythrocytes and in RBL-2H3 mast cells. In the present work, we observed that this peptide is able to permeate anionic liposomes, and in less extension also the neutral ones. We present evidences showing that the permeation ability is well correlated with the amount of helical conformation assumed by the peptides in these environments. This peptide also showed a broad-spectrum inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The permeability of liposomes and the antibiotic effect showed a significant reduction when C-terminus was deamidated (in acidic form). The removal of the three first amino acid residues from the N-terminus rendered the peptide inactive both in liposomes and in bacteria. The results suggest that the mechanism of action involves a threshold in the accumulation of the peptide at level of cell membrane.

Abbreviations: CD, circular dichroism; CF, carboxyfluoresceine; CFU, colony forming units; CMC, critical micelle concentration; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMP-AF, eumenine mastoparan – *Antherichium flavomarginaticado*; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; Fmoc, N-9-fluorophenyl metoxycarbonyl; LUV, Large unilamellar vesicle; MALDI-TOF-MS, matrix assisted laser desorption ionization time of fly mass spectrometry; MIC, minimum inhibitory concentration; MP, mastoparan; MP-B, mastoparan B; MP-X, mastoparan X; PC, phosphatidylcoline; PG, phosphatidylglycerol; SUV, small unilamellar vesicle.

Introduction

Antimicrobial peptides are used for many organisms from plants to mammals as part of their host defense systems (1–6). The biological activity of these peptides is centered in the lysis and permeation of the cell membrane and, as a consequence, their molecular targets are the lipids constituents of the cell membrane.

Different mechanisms are currently known to explain the mechanism of action of antibacterial peptides: (i) in the barrel-stave model peptide monomers associate and form a bundle of helices embedded in the membrane, forming a transmembrane channel (7,8); (ii) in the ‘carpet-like’ model the peptides act like detergents, forming eventually toroidal pores (1,9). In both models the physico-chemical properties of peptides, such as: length, charge distribution, net charge, volume, amphipathicity and oligomeric state in solution, play essential roles in peptide interactions with the membrane surface and/or with the membrane core. These peptides can differ significantly in their primary sequences, length and structures; they may be linear, or cyclic because of the existence of disulfide bridges. Some adopt an α -helical, β -sheet or even a combination of both structures (10); despite this, most of these peptides seem to adopt an amphiphatic arrangement, with the hydrophobic and charged faces, arranged in opposite positions, when in contact with the bacterial membrane.

Bacterial membrane presents the outermost leaflet rich in negatively charged phospholipids, while the external surface of animal cells are predominantly composed of neutral phospholipid (5). Besides the zwitterionic lipids the animal cells present high concentration of cholesterol, which acts stabilizing the bilayer (1,11). The lipid composition of the cell membranes has been shown to be of paramount importance to determine the selectivity of peptide permeabilization activity. An important aspect of the antimicrobial peptides is the presence of positively charged residues distributed along the peptide chain in order to generate an amphiphatic structure. The presence of these charged groups generally renders the peptide more active against bacteria. On the contrary, due to the unfavourable interaction of these peptides with neutral bilayer added to the stabilizing effect of the cholesterol present in these membranes, most of these peptides are practically inactive in mammal cells. However, some cationic peptides, produced in general in sac venom of animals, such as mastoparan (MP) and melittin have been shown to be active in both types of membranes (6).

Eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) is the main peptide component of the venom extract from the solitary wasp, *Anterhynchium flavomarginatum micado* (12). Like other mastoparans, EMP-AF is a tetradecapeptide rich in hydrophobic and basic amino acids, presenting amidated C-terminus. Three analogues, EMP-AF₁, 2 and 3 were occasionally isolated from the venom extract probably because of enzymatic action during storage of collected wasps and dissection procedure. These analogues present either unprotected C-terminus (EMP-AF₁) or a removal of three first amino acid residues in the N-terminus with amidated C-terminus (EMP-AF₂) or still unprotected C-terminus (EMP-AF₃) (12).

Compared with MP, EMP-AF conserved the sequence of the first three amino acid residues at N-terminal region, while seven of 11 remaining amino acid residues are common (Fig. 1). The presence of three lysines and seven hydrophobic residues suggest an amphiphilic nature for this family of peptides, which was confirmed by their helical wheel projection (12). MP and mastoparan X (MP-X) are random coil in aqueous solution and adopt helical conformation, like many other membrane-binding peptides do, in presence of organic solvents, micelles or phospholipid vesicles (13,14). MP and mastoparan B (MP-B) present considerable antimicrobial activity against Gram-positive microorganisms (13) and enhance phospholipase A₂ activity (15). Similar to other peptides extracted from animal venoms, like melittin, they are haemolytic and stimulate histamine secretion from mast cells (6).

Haemolytic and mast cell degranulation activities of EMP-AF and its analogues were previously investigated by using synthetic peptides (12). MP was 10 times more lytic to human erythrocytes than EMP-AF, while EMP-AF analogues showed virtually no haemolytic activity. A similar behaviour was also observed for degranulation activity on RBL-2H₃ cells. Contrasting with this result, however, EMP-AF and its analogues were shown to be very potent mast cell degranulators on rat peritoneal mast cells.

These previous results have suggested that the primary sequence and probably the secondary structure adopted at

EMP-AF	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH ₂
EMP-AF 1	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-OH
EMP-AF 2	Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH ₂
EMP-AF 3	Leu-Lys-Ile-Ala-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-OH
MP	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂
MP-B	Leu-Lys-Leu-Lys-Ser-Ile-Val-Ser-Trp-Ala-Lys-Lys-Val-Leu-NH ₂
MP-X	Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂

Figure 1. Amino acid sequences of the eumenine mastoparan-AF (EM-AF), its analogues EMP-AF_{1–3}, mastoparan (MP), mastoparan B (MP-B), and mastoparan X (MP-X).

level of biological membranes are very important to modulate their biological activities. In the present work, we have correlated conformational analysis of EMP-AF and its analogues both to dye leakage experiments from neutral and charged vesicles and to antimicrobial activity, aiming to understand the molecular mechanisms involved with their biological activities. The conformational analysis of EMP-AF and its analogues were carried out by circular dichroism (CD) under different environments mimicking biological membranes by using neutral and anionic vesicles.

Materials and Methods

Peptide synthesis and purification

The peptides were synthesized by stepwise manual solid-phase synthesis using *N*-9-fluorophenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. The crude products were purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), and the homogeneity and sequence were accessed by analytical HPLC and mass spectrometry (MALDI-TOF-MS and ESI-MS).

Vesicle preparation

The L- α -phosphatidylcholine (PC) liposomes composed respectively by PC and PCPG (70 : 30; 70% L- α -phosphatidylcholine and 30% L- α -phosphatidyl-DL-glycerol) have been prepared. Phospholipids dissolved in chloroform have been dried under N₂ flux on round bottom flasks. The lipid film was completely dried under vacuum for at least 3 h and afterwards hydrated with 1 mL Tris buffer (Tris/H₃BO₃ 5 mM, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.5 for CD experiments or with Tris/HCl 10 mM, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.5, containing carboxyfluorescein (CF) 25 mM for fluorescence experiments. In both preparations, the final lipid concentration was around 10 mM. The suspension was sonicated under N₂ flux, in ice/water bath, for 25 min, to produce small unilamellar vesicles (SUVs), necessary for the CD measurements or, 5 min, to produce large unilamellar vesicles (LUVs) used in dye release experiments. Titanium debris has been removed by centrifugation. Dye-entrapped LUVs were separated from free dye by gel filtration on a Sephadex G25M column. Finally they have been submitted to 11 times extrusion through two stacked 0.2 μ m polycarbonate filters. All vesicles were used within 48 h of preparation. The lipid concentration was determined by phosphorus analysis (16).

Circular dichroism measurements

The CD spectra were measured over the range of 190–250 nm, using a Jasco-710 spectropolarimeter (Tokyo, Japan). The instrument was calibrated using d-10-camphorsulfonic acid. Spectra were collected from 190 to 250 nm at 25 °C using cells with a path length of 0.5 cm, and averaged over four scans. Data points were recorded at a scan speed of 20 nm/min, bandwidth of 1.0 nm, 0.5 s response and 0.1 nm resolution. Following baseline correction, the observed ellipticity, θ (mdeg) was converted to mean residue ellipticity $[\Theta]$ (deg cm²/dmol), using the relationship $[\Theta] = 100\theta/(lcn)$ where ' l ' is the path length in centimetres, ' c ' is peptide millimolar concentration, and ' n ' the number of residues in the peptide. Assuming a two-state model the observed mean residue ellipticity at 222 nm (Θ_{222}^{obs}) was converted in α -helix fraction (f_H) using the method proposed by Rohl and Baldwin (17) and described previously (18). Investigation of the binding mechanism of EMP-AF and -AF1 has been carried out adding successive amounts of vesicles to 10 μ M peptide solution in Tris buffer, ranging from 10 : 1 to 150 : 1 lipid to peptide (L/P) molar ratio. The α -helix fractions measured at 222 nm have been calculated as indicated above.

Dye leakage

A volume of fresh LUV suspension was injected into a cuvette containing magnetically stirred peptide solutions of different concentrations to give final volume of 1.0 mL. CF release from the vesicles was monitored at 520 nm (excited at 490 nm) on a Hitachi Fluorometer F4500 (Tokyo, Japan) by measuring the decrease in self-quenching at 25 °C. Percentage of dye leakage was determined after regular time intervals, and calculated with the equation: %leakage = $100 \times (F - F_0)/(F_{100} - F_0)$, where F is the observed fluorescence intensity, F_0 and F_{100} corresponds to the fluorescence intensities in the absence of peptides and to 100% leakage was determined by the addition of 10 μ L of 10% Triton X-100.

Antimicrobial activity (determination of minimal inhibitory concentration)

The microorganisms used were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (clinical species), *Staphylococcus epidermidis* (clinical species), *Bacillus subtilis* (CCT 2471), *Bacillus thuringiensis*

(wild species), *Acinetobacter* sp. (wild species), *Escherichia coli* (CCT 1371, ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Pseudomonas mirabilis* (clinical species), *Pneumoniae aeruginosa* (ATCC 15442), and *Candida albicans* (UMP). Serial dilution of peptide was prepared in sterilized water. Aliquots were placed in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplates containing Müeler-Hinton broth in a final volume of 200 μL . The mixture was completed by inoculation of 10 μL of bacterial culture growing in logarithmic-phase of microorganism as monitored by the absorbance at 600 nm. The final cells number ($1 \times 10^5/\text{mL}$) was determined by plate counting. The plates were incubated at 35 $^\circ\text{C}$ and aliquots of 10 μL were removed both at the beginning of assay and after overnight incubation, and then plated in Müeler-Hinton agar. The number of colony-forming units (CFU) was determined. The results were expressed as inhibition percentage of CFU against a control; this control was obtained in each situation by counting the number of microorganisms introduced into the plate in the absence of peptide.

Results

Conformational investigation: CD spectroscopy

The secondary structure of EMP-AF and analogues were determined by CD spectroscopy. CD spectra of EMP-AF in water or Tris buffer confirm an unordered conformation of the peptides. In 40% trifluoroethanol (TFE), sodium dodecyl sulphate (SDS) above the critical micelle concentration (CMC) (approximately 8 mM) and liposomes, shown in the Fig. 2A,B, the presence of two negative dichroic bands at 208 and 222 nm is consistent with the formation of α -helix. The values of the α -helix fraction (f_H) estimated for EMP-AF and analogues in these conditions are presented in the Table 1. These values show that f_H of each peptide depend on the environment and on the peptide length. The potential of the peptide to adopt helical conformation is dependent on the individual helix propensity of the residues and on the environment. Different scales of helical propensity have been measured in different environments: TFE (17), micellar SDS (19) and anionic vesicles (20). Independently of the propensity scale used, all the residues composing EMP-AF and analogues (I, N, L, K, A, G and S), have their helical propensity increased TFE, micellar SDS and anionic vesicles. Even the low helix inductor serine and the helix breaker glycine (21) have their helical propensities strongly increased. In this way, the high helical fraction

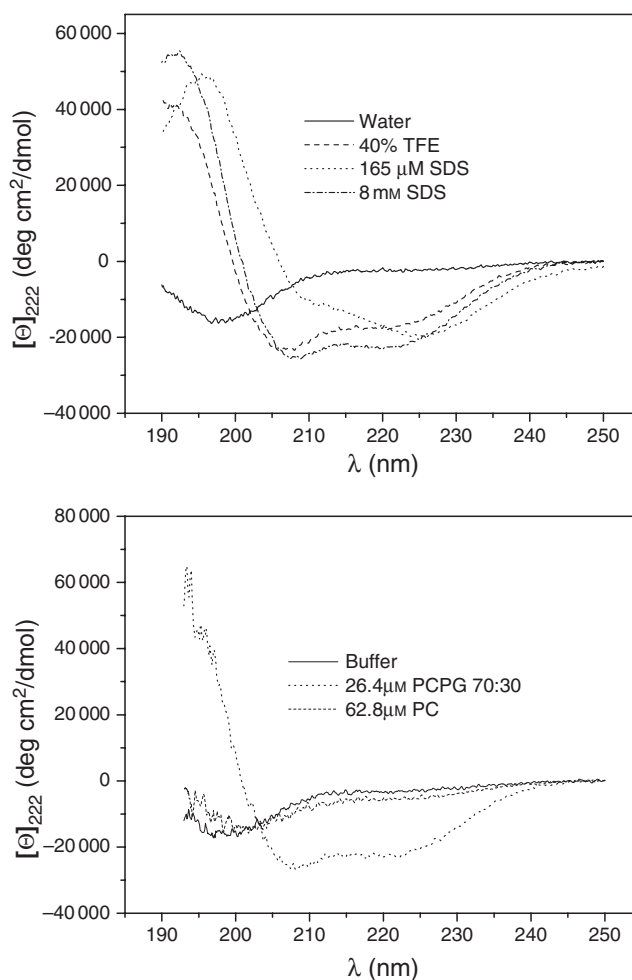


Figure 2. Circular dichroism (CD) spectra of the eumenine mastoparan-AF (EMP-AF). Spectra were recorded with 10 μM of peptide at 25 $^\circ\text{C}$ in the following conditions: (A) aqueous buffer (—), in the presence of 40% trifluoroethanol (TFE; - - -) and in 165 μM sodium dodecyl sulphate (SDS; ·····) and 10 mM SDS (-----) below and above CMC. (B) In the presence of (—) buffer, (· · · · ·) 26.4 μM L- α -phosphatidylcholine/L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PC/PG; 70 : 30) and (-----) 62.8 μM PC liposomes.

Table 1. α -Helix fraction (f_H) of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) and analogues in different conditions

	TFE ^a	SDS ^b	PCPG ^c	PC ^d
EMP-AF	0.54	0.72	0.73	0.16
EMP-AF1	0.22	0.29	0.28	0.06
EMP-AF2	0.14	0.28	0.14	0.04
EMP-AF3	0.13	0.06	0.10	0.06

a. 40% trifluoroethanol (TFE).

b. >8.0 mM sodium dodecyl sulphate (SDS).

c. P/L ratio = 1 : 2.6; PCPG, L- α -phosphatidylcholine and L- α -phosphatidyl-DL-glycerol.

d. P/L ratio = 1 : 6.3.

observed in these environments, compared with buffer, could be attributed to the increase in the residue helical propensity.

The values displayed in the Table 1, also, strongly support that the modifications in the wild-type peptide to produce the three analogues have pronounced effect in the helix fraction. The deamidation of the C-terminus of this peptide giving rise to EMP-AF₁, introduces a negative charge in the negative pole of the helix macrodipole, destabilizing the helical structure (22,23). The difference in the helix fraction observed for EMP-AF and EMP-AF₁, in TFE and PC/PG vesicles seem to be consistent with this destabilizing effect. The removal of three residues at the N-terminus, forming the analogue EMP-AF₂, decreases the chain length and consequently the number of possible carbonyl to amide hydrogen bonds in the peptide backbone, rendering the secondary structure less stable. Besides this effect, the basic residue Lys5 is brought near to the positive pole of the helix macrodipole that also presents a helix destabilizing effect (22,23). Further, deamidation of this analogue producing EMP-AF₃ destabilizes the helix compared with EMP-AF₂ as exposed above. In this way, the decrease in the α -helix fraction observed for the peptides from EMP-AF through EMP-AF₃ is compatible with the helix destabilization effect induced by the unfavourable interaction which occurs when a side chain electrical charge interact with a pole of the helical macrodipole with the same signal.

Table 1 also suggests that the electrostatic interaction and the peptide length play important role in stabilizing the helical conformation. In micellar SDS and anionic vesicles the fractions of α -helix measured are well correlated with these parameters. The importance of the electrostatic interaction is more clearly observed when one compares the amount of secondary structure for anionic and neutral vesicles. Longer peptides in neutral vesicles were observed to have only approximately 20% of the α -helix fraction observed in anionic one, while for shorter analogues this reduction is lessened. It was observed that the α -helix fraction of EMP-AF in PC vesicles increases reaching 53% at high lipid concentration (P/L = 1 : 150). In this P/L concentration ratio EMP-AF₁ tends to maintain its low helical level.

Leakage experiments

The membrane permeating activity induced by peptides was investigated through the release of CF from PC and PCPG LUVs. EMP-AF induced almost complete leakage in anionic vesicles within 10 min at P/L 1 : 10. At the same peptide concentration (10 μ M), however, <50% CF was re-

leased from neutral (PC) liposomes. The higher lytic activity in anionic vesicles is in very good agreement with the results obtained for MP-X (24) and for other cationic peptides (25). Reducing EMP-AF concentration to 3.75 μ M only 50% leakage was observed in PCPG vesicles while leakage was drastically reduced (approximately 5%) in neutral vesicles. Below 30 min contact time, no significant differences were observed for the shorter peptides interacting with the two types of vesicles (data not shown). The efficiency of the wild-type peptide to induce dye leakage from vesicles was strongly dependent not only on the liposome surface charge density but also on the peptide to lipid concentration ratio (P/L). For longer peptides, the presence of the carboxyl group in the C-terminus (EMP-AF₁) strongly reduced the efficiency of leakage for both types of liposomes. The efficiency to leakage anionic liposomes is lower for EMP-AF₂ and -AF₃ than for EMP-AF₁. Both shorter peptides almost did not induce dye release from zwitterionic liposomes. For these shorter peptides the deamidation of the C-terminus seem to have a minor importance for the lytic activity in vesicles.

We have found a sigmoidal concentration dependence for the dye leakage activity of EMP-AF as shown in Fig. 3A,B. This behaviour was observed for both types of vesicles (PC and PCPG). The sigmoidal dependence indicates a cooperative process and suggests the existence of a critical peptide concentration in the vesicle surface to induce leakage. Similar behaviour was observed for MPs (24) and other pore-forming peptides such as melittin (26). A nonsigmoidal

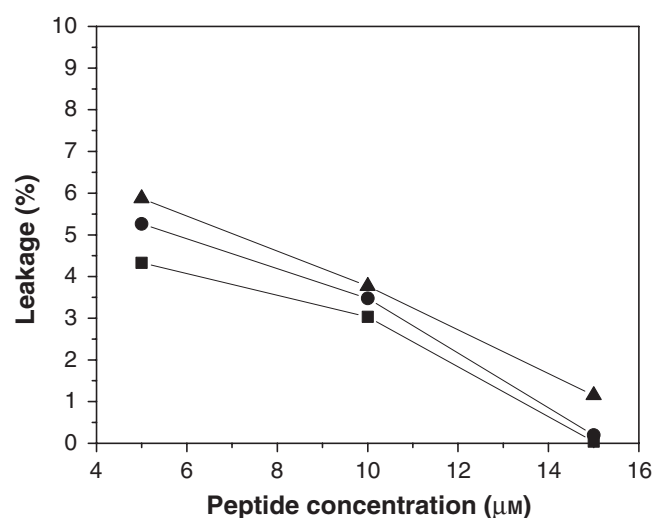


Figure 3. Leakage of the fluorescent probe carboxyfluorescein from (A) L- α -phosphatidylcholine (PC) and (B) PC/L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) (7 : 3, w/w) liposomes induced by eumenine mastoparan-AF (EMP-AF). Percentage leakage was plotted within ■, ● 15 and ▲ 25 min. Lipid concentration 100 μ M.

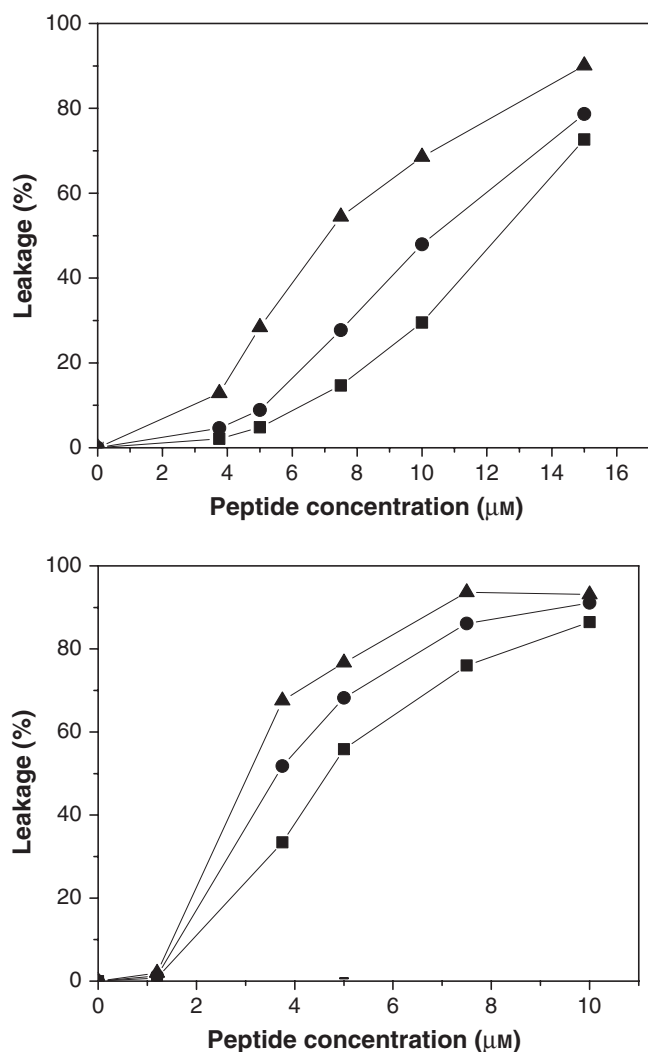


Figure 4. Leakage of the fluorescent probe carboxyfluorescein from L- α -phosphatidylcholine/L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PC/PG; 7 : 3, w/w) liposomes induced by eumenine mastoparan-AF (EMP-AF). Percentage leakage was plotted within ■ 5, • 15 and ▲ 25 min. Lipid concentration 100 μ M.

dose–response curve was observed for EMP-AF₃ in PCPG vesicles. The leakage efficiency of this peptide decreases with the increase in the peptide concentration as shown in Fig. 4. At the higher peptide concentration almost no leakage was observed when compared with EMP-AF. It is remarkable that the leakage efficiency in both types of liposomes is well correlated with the α -helix fraction of the peptide in the vesicles.

Antimicrobial activities

The antimicrobial activities of EMP-AF and its analogues are summarized in Table 2. EMP-AF is far more effective against most types of bacteria than EMP-AF_{1–3} either on Gram-positive bacterial strains or on Gram-negative one. These experiments showed that the potency of EMP-AF is higher for Gram-positive bacteria, in good agreement with the results obtained for MP (27). It can also be seen that EMP-AF₁ (same chain length, carboxylated C-terminus) shows significantly lower bactericidal action than the amidated C-terminus, EMP-AF as also observed for other deamidated peptides (28,29). The shorter peptides EMP-AF₂ and -AF₃ present only a marginal antimicrobial activity, independent of the nature of their C-terminus.

Discussion

The CD spectra of EMP-AF in an environment mimicking the hydrophobicity and anisotropy of a bilayer are characteristic of helical conformation. This was observed for micellar SDS and also for vesicles. The amount of helical

Table 2. Antimicrobial activity of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) and its analogues, minimal inhibitory concentration (MIC)

Microorganism	MIC (μ g/mL)			
	EMP-AF	EMP-AF1	EMP-AF2	EMP-AF3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	5	100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	10	>100	>100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (CS)	5	25	>100	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CS)	5	50	>100	>100
<i>Staphylococcus subtilis</i> CCT 2471	40	100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> CCT 1371	20	50	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50	25	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	20	100	>100	>100
<i>Candida albicans</i>	–	>100	>100	>100

conformation was observed to be dependent on the presence of charged groups both in SDS and in PC/PG vesicles, as observed for other cationic peptides (25,30), emphasizing the importance of the electrostatic interactions besides the hydrophobic contacts. In these environments, the helical propensities of the residues that compose the peptides are higher than in buffer increasing the helical content of the peptides (19,20,30). However, the comparison of the f_H for the four peptides studied, for a given medium, suggests that, besides the electrostatic interaction, the state of the C-terminal is very important for both the helix stability and the lytic activity of the peptides. The presence of a negative charge in the negative pole of the helix macro-dipole, because of deamidation, as well as the presence of the Lys5, as a result of the removal of three residues, near its positive pole destabilize the helix in TFE and in the anionic environment studied. In addition to the effect of helical macro-dipole, it is noteworthy that protection of the C-terminus showed to have another stabilizing effect on the helical conformation because of an extra hydrogen bonding between the amide group and L13 carbonyl in the peptide backbone as was observed from the nuclear magnetic resonance (NMR) structure (31). The absence of charged head group in lipid bilayer, however, seems to be more important than the helical propensity and helix macro-dipole effect to determine the α -helix fraction in neutral liposomes. The helical conformation in zwitterionic vesicles is only achieved in higher lipid to peptide ratio (150 : 1), indicating that EMP-AF presents lower binding affinity to neutral than to anionic vesicles. This behaviour is similar to other cationic peptides (32–34).

In this way, the lower helical fraction of EMP-AF in PC vesicles is related to the lower affinity to this vesicles because of the absence of electrostatic interaction between the peptide and the phospholipid bilayer. The helical fraction for EMP-AF2 and -AF3 in TFE is similar to that observed for EMP-AF in PC vesicles, however, this lower f_H in TFE for shorter peptides would be attributed to the chain length and to the effects of helix macro-dipole in destabilizing the helical conformation.

The permeating efficiency of the peptides studied in anionic and neutral liposomes are well correlated with their helical content in these vesicles. The dose–response curves for EMP-AF in neutral vesicles (Fig. 3A,B) showed that the percentage of dye leakage induced by EMP-AF presents a sigmoidal dependence on the peptide concentration. This dependence of the dose–response curve suggests that the peptides accumulate in the vesicle till to achieve a critical concentration beyond which the leakage increases

cooperatively. The peptide accumulation to induce leakage has been shown to be an important aspect in the current model proposed by Matsuzaki, Shai and Huang (MSH) (1, 7–9) to explain the mechanism of action of the pore-forming antimicrobial peptides.

The dose–response curve for shorter peptide, EMP-AF3, even in anionic vesicles, Fig. 4, shows that the increase in peptide concentration leads to the reduction in the permeating activity in vesicles, in opposition to that observed for EMP-AF. It is remarkable that although the leakage observed in the Fig. 4 is very low it is higher than the experimental error (approximately 2% averaged from three measurements). Thus, the tendency to reduce the leakage to zero, when the peptide concentration is increased to 15 μM , indicates the absence of a sigmoidal dose–response curve. This behaviour suggests that for shorter peptides, at least in the same concentration range used for EMP-AF, there is no peptide accumulation in vesicle surface or that if it takes place it should be nonlytic.

It is noteworthy that the cooperative leakage processes in liposomes were observed for peptides with high helical contents in these vesicles. This found reinforces the correlation between helical conformation and the lytic activity and evidence its importance on the mechanism of action of these peptides. Thus, the higher helical content in anionic vesicles and the higher efficiency to leakage these vesicles observed for EMP-AF were well correlated with its antimicrobial activity. The reduced haemolytic activity of this peptide (12) is also well correlated with its lower preference for neutral vesicles. Interestingly, in spite of the presence of charged lipopolysaccharides in the bacterial wall and sialic acid content glycoprotein in erythrocytes, it was observed a good correlation between lytic activity in membrane models and in biological cells. Deamidation of the C-terminus (EMP-AF1) reduces its antimicrobial potency while the haemolytic activity is suppressed (12) in good agreement with the lytic and helical content in zwitterionic vesicles.

The shorter analogues EMP-AF2 and -AF3 were virtually inactive in human erythrocytes, in RBL-2H3 mast cell and in bacteria. These observations are well correlated with its lower helical content in both anionic and zwitterionic vesicles and also to its reduced leakage efficiency displaying a nonsigmoidal dose–response curve.

The EMP-AF and EMP-AF1 present lower haemolytic activity than MP in human erythrocytes as well as lower degranulating activity in RBL-2H3 cells (12). In contrast EMP-AF, its deamidated analogue and MP present similar potency in rat peritoneal mast cell. The selectivity to these

cells could be due to its lipid composition. It was observed that some peptides are selective for erythrocytes of different species as reported by Huang *et al.* (7). However, if the lipid constituents of cell membrane for these mast cells were not different, the increased activity in rat peritoneal mast cell could be attributed to the presence of a specific receptor in these cells (35–38).

Acknowledgements: Authors are grateful to Prof. Iolanda Cuccovia (Chemistry Institute, University of São Paulo) for her personal help with all matters related to liposomes preparation and analysis. WFA (CNPq, 300851/98-7) and MSP (CNPq, 500079/90-0) are researchers for the Brazilian Council for Scientific and Technological Development. This work was supported in part by CAPES, FAPESP Brazilian agencies and CAT-CEPID.

References

- Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptides-lipid interactions utilized for self defence? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 1–10.
- Shai, Y. (1995) Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *TIBS* **20**, 460–464.
- Epanand, R. & Vogel, H.J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 11–28.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. Jr & Ezekowitz, R.A.B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313–1318.
- Matsuzaki, K. (2001) Why and how are peptides-lipid interactions utilized for self-defence? *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 598–601.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395.
- Huang, H.W. (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* **39**, 8347–8352.
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T. & Huang, H.W. (2003) Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **84**, 3751–3758.
- Oren, Z. & Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451–463.
- Bullet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. & Hoffman, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fuji, N. & Miyagima, K. (1995) Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34**, 3423–3429.
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y. & Nakata, Y. (2000) Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF(EMP-AF) a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Antherichium flavomarginatum micado*). *Toxicon* **38**, 1505–1515.
- Park, N.G., Yamato, Y., Lee, S. & Sugihara, G. (1995) Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers* **36**, 793–801.
- Chuang, C., Huang, W., Yu, H., Wang, K. & Wu, S. (1996) Conformation of *Vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1292**, 1–8.
- Argiolas, A. & Pisano, J.J. (1983) Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* **258**, 13697–13702.
- Rouser, G., Fleischer, S. & Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494–496.
- Rohl, C.A. & Baldwin, R.L. (1998) Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods Enzymol.* **295**, 1–26.
- Konno, K., Hisada, M., Fontana, R., Lorenzi, C.C.B., Naoki, H., Itagaki, Y., Miwa, A., Kawai, N., Nakata, Y., Yasuhara, T., Ruggiero Neto, J., Azevedo, W.F. Jr, Palma, M.S. & Nakajima, T. (2001) Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1550**, 70–80.
- Blondelle, S.E., Forood, B., Houghten, R.A. & Pérez-Payá, E. (1997) Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. *Biopolymers* **42**, 489–498.
- Deber, C.M. & Li, S.-C. (1995) Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* **37**, 295–318.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222–244.
- Creighton, T.E. (1993) *Proteins Structure and Molecular Properties*. pp. 182–186. W.H. Freeman, San Diego, CA, USA.
- Shomaker, K.R., Kim, P.S., Brems, D.N., Marqusee, S., York, E.J., Chaiken, I.M., Stewart, J.M. & Baldwin, R.L. (1985) Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **82**, 2349–2353.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Murase, O. & Miyajima, K. (1996) Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* **35**, 8450–8456.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**, 146–150.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. & Huang, H.W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**, 1475–1485.
- Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Yamanaka, H., Shinoda, S. & Fujita, Y. (1990) Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1027**, 185–190.
- Nakagima, Y., Qu, X. & Natori, S. (1987) Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* **262**, 1965–1968.
- Mor, A. & Nicolas, P. (1994) The NH₂-terminal α -helical domain 1–18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 1934–1939.
- Blondelle, S.E., Lohner, K. & Aguilar, M.-I. (1999) Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 99–108.

31. Sforça, M.L., Oyama, S. Jr, Canduri, F., Lorenzi, C.C.B., Pertinhez, T.A., Konno, K., Souza, B.M., Palma, M.S., Ruggiero Neto, J., Azevedo, W.F. Jr & Spisni, A. (2003) How C-terminal carboxyamidation alter the mast cell degranulating activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. *Biochemistry* **43**, 5608–5617.
32. Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C. & Bienert, M. (2002) General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1558**, 171–186.
33. Schwarz, G. & Blochmann, U. (1993) Association of the wasp venom peptide mastoparan with electrically neutral lipid vesicles. *FEBS Lett.* **318**, 172–176.
34. Hellmann, N. & Schwarz, G. (1998) Peptide-liposome association: a critical examination with mastoparan-X. *Biochim. Biophys. Acta* **1369**, 267–277.
35. Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. & Ross, E.M. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptor by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* **263**, 6491–6494.
36. Higashijima, T., Burnier, J. & Ross, E.M. (1990) Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* **265**, 14176–14186.
37. Ross, E.M. & Higashijima, T. (1994) Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. *Methods Enzymol.* **237**, 26–37.
38. Delatorre, P., Olivieri, J.R., Ruggiero Neto, J., Lorenzi, C.C.B., Canduri, F., Fadel, V., Konno, K., Palma, M.S., Yamane, T. & de Azevedo, W.A. Jr (2001) Preliminary cryocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*. *Biochim. Biophys. Acta* **1545**, 372–376.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*

Katsuhiro Konno^{a,*}, Miki Hisada^b, Hideo Naoki^c, Yasuhiro Itagaki^d, Renato Fontana^e, Marisa Rangel^a, Joacir Stolarz Oliveira^a, Marcia Perez dos Santos Cabrera^f, João Ruggiero Neto^{a,f}, Izumi Hide^g, Yoshihiro Nakata^g, Tadashi Yasuhara^h, Terumi Nakajimaⁱ

^a Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

^b Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto, Osaka 618-8503, Japan

^c Tropical Technology Center Ltd., Gushikawa, Okinawa 904-2234, Japan

^d Department of Chemistry, Columbia University, New York, NY 10027, USA

^e Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, Ilhéus, BA 45650-000, Brazil

^f Department of Physics, Institute of Biosciences, Letters, and Exact Sciences, São Paulo State University São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^g Department of Pharmacology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan

^h Department of Nutrition, Junior College of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan

ⁱ Hoshi University, Shinagawa, Tokyo 142-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2005

Received in revised form

8 April 2006

Accepted 19 April 2006

Keywords:

Eumenitin

Solitary wasp venom

Antimicrobial peptide

Cationic linear α -helical peptide

Amphipathic α -helix structure

Abbreviations:

MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

CPY, carboxypeptidase Y

APM, aminopeptidase M

PSD, post-source decay

ABSTRACT

A novel antimicrobial peptide, eumenitin, was isolated from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. The sequence of eumenitin, Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Ile-Phe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Leu-Leu-Thr, was mostly analyzed by mass spectrometry together with Edman degradation, and corroborated by solid-phase synthesis. This peptide has characteristic features of cationic linear α -helical antimicrobial peptides, and therefore, can be predicted to adopt an amphipathic α -helix secondary structure. In fact, the CD spectra of eumenitin in the presence of TFE or SDS showed a high content of α -helical conformation. Eumenitin exhibited inhibitory activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and moderately stimulated degranulation from the rat peritoneal mast cells and the RBL-2H3 cells, but showed no hemolytic activity against human erythrocytes. This antimicrobial peptide in the eumenine wasp venom may play a role in preventing potential infection by microorganisms during prey consumption by their larvae.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3726 1024; fax: +55 11 3726 1024.

E-mail address: kk-gon@butantan.gov.br (K. Konno).

0196-9781/\$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2006.04.013

CID, collision-induced dissociation
 CD, circular dichroism
 TFE, trifluoroethanol
 SDS, sodium dodecylsulfate
 HEPES, (N-[2-hydroxyethyl]
 piperazine-N'-[2-ethanesulfdonic
 acid]
 PBS, phosphate buffered saline

1. Introduction

Antimicrobial peptides are widely found in plants, insects, amphibians and mammals, playing an important role in innate immune systems and host defense mechanisms. They have attracted much attention as a novel class of antibiotics, in particular for antibiotic-resistant pathogens, because of their action mechanism of non-selective interaction with cell surface membranes of microbes [1,2,7,27]. In most cases, antimicrobial peptides are produced when challenged by microbes, but recent studies demonstrated that they are also contained in arthropod venoms, and may play a role for preventing potential infection [15,24].

We have recently surveyed bioactive substances in solitary wasp venom, in particular neurotoxins, because the venom is used for paralyzing their preys. As a consequence, we indeed isolated novel peptide neurotoxins [10,11,14], but also found antimicrobial peptides. Anoplin, the first antimicrobial peptide to be found in solitary wasp venom, was isolated from the *Anoplius samariensis* venom and showed both antimicrobial and mast cell degranulating activity [13]. This peptide is the smallest among the linear α -helical antimicrobial peptides ever found in natural sources, composed of 10 amino acids with amphiphilic property. Eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) is a mast cell degranulating peptide isolated from the venom of the eumenine wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado* [12]. This peptide belongs to the mastoparan family of cytolytic peptides found in various social wasp venoms, and shows also potent antibacterial activity [21]. Thus, our recent studies indicated that solitary wasp venoms may be a rich source of bioactive peptides, peptide neurotoxins and antimicrobial peptides, as well as other arthropod venoms.

A further survey of solitary wasp venom components led to the isolation of another linear α -helical antimicrobial peptide designated eumenitin from the venom of the eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. Reported herein are the isolation, structural analysis including the secondary structure by circular dichroism (CD), lytic activity by dye leakage from vesicles and biological activities of eumenitin.

2. Materials and methods

2.1. Purification

Female wasps of *Eumenes rubronotatus* were collected at Sagamiko, Ibaraki, and Kyoto in Japan. The collected specimens were immediately frozen by dry ice and kept at -75°C

until use. The venom sacs were dissected immediately after thawed and lyophilized.

Forty five lyophilized venom sacs were extracted (5×1 ml) with 1:1 acetonitrile-water containing 0.1% TFA ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA) and the extracts were subjected to reverse-phase HPLC (Waters Associates, Milford, MA, USA) using CAPCELL PAK C_{18} , 10×250 mm (SHISEIDO Co., Ltd., Tokyo, Japan) with linear gradient from 5% to 95% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA at a flow rate of 2.5 ml/min over 30 min (Fig. 1A) to give eumenitin eluted at 21.5 min.

2.2. Mass spectrometry

All mass spectra were acquired on a Voyager Elite MALDI-TOFMS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a delayed extraction source and 337 nm pulsed nitrogen

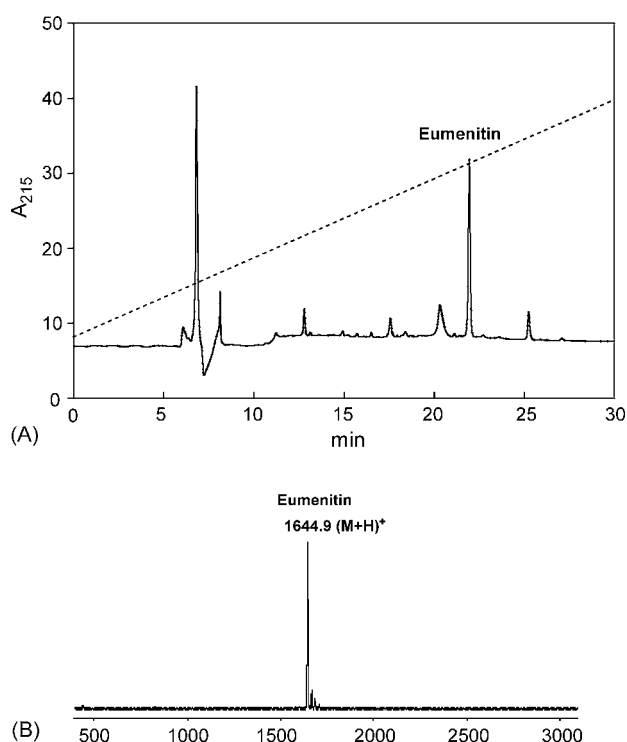


Fig. 1 – (A) Fractionation of venom extracts of *Eumenes rubronotatus* by reverse-phase HPLC using CAPCELL PAK C_{18} (10×250 mm) with linear gradient of 5–95% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA over 30 min at flow rate of 2.5 ml/min. UV absorption was monitored at 215 nm. (B) The MALDI-TOF MS of eumenitin obtained from the major peak at 21.5 min in Fig. 1A.

laser. The accelerating voltage was 20 kV. Argon gas was used for the CID/PSD experiment. A Matrix, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich) was prepared at a concentration of 10 mg/ml in 1:1 CH₃CN/0.1%TFA. The sample (0.5 μ l) dropped onto the MALDI sample plate was added to the matrix (0.5 μ l) and allowed to dry at room temperature. The instrument was externally calibrated on a mixture of des-Arg¹-bradykinin (m/z 904.47, monoisotopic) and hACTH 18–39 (m/z 2465.29, monoisotopic; 2466.71, average).

2.3. Amino acid sequencing

On-plate exopeptidase digestion was applied for peptide ladder sequencing. Carboxypeptidase Y (CPY, pH 6.0, Sequazyme kit from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for C-terminal sequencing, and N-terminal sequencing was performed by using aminopeptidase M (APM, pH 7.5, 2.5 μ g/ μ l from Boehringer–Mannheim, Indianapolis, IN).

An aqueous solution of peptide (0.5 μ l) and an enzyme (0.5 μ l) were mixed on the sample plate, and after 7 min incubation at room temperature, a matrix solution (0.5 μ l of saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 1:1 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA) was added and air dried for MALDI-TOF MS analysis.

Automated Edman degradation was performed by a gas-phase protein sequencer PPSQ-10 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

2.4. Peptide synthesis

Peptide was synthesized by stepwise solid-phase method using *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with Fmoc-Thr(tBu)-NovaSyn[®] TGA resin (Nova Biochem.) on a Shimadzu PSSM-8 peptide synthesizer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). All Fmoc-L-amino acids were purchased from Nova Biochem. The side chain protective groups were *tert*-butyloxycarbonyl (*t*-Boc) for Lys, trityl (Trt) for Asn, and *tert*-butyl (*t*-Bu) for Ser and Thr. Cleavage of the peptide from the resin was achieved by treatment with a mixture of TFA/anisole/1,2-ethanedithiol (94:5:1, by volume) using 10 ml/g resin at room temperature for 2 h. After removal of the resin by filtration and washing twice with TFA, the combined filtrate was added dropwise to diethyl ether at 0 °C and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Thus obtained crude synthetic peptide was purified by semipreparative reverse-phase HPLC using CAPCELL PAK C₁₈, 10 \times 250 mm with isocratic elution of 40% CH₃CN/H₂O/0.1% TFA at a flow rate of 2.5 ml/min. The homogeneity and the sequence was confirmed by MALDI-TOF MS. The HPLC elution profile of the synthetic peptide was identical with that of the natural peptide.

2.5. Vesicle preparation

Lipids: L- α -phosphatidylcholine (PC) and L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) and carboxyfluorescein (CF) were purchased from Sigma–Aldrich Co (S. Louis, MO); 2,2,2, trifluoroethanol (TFE), tris(hydroxymethyl)amino-methane (Tris) and triton X-100 from Merck (Darmstadt, Germany) and SDS and PD-10 disposable columns from Pharmacia Fine Chem. (Upsalla, Sweden). Water used was deionized and quartz distilled.

LUVs, large unilamellar vesicles, and SUVs, small unilamellar vesicles, either made of PC (100% phosphatidylcholine) or PC/PG 70:30 (70% phosphatidylcholine and 30% phosphatidyl-DL-glycerol) were prepared as previously described [21]. Briefly, dry lipid films have been hydrated with 1 ml Tris buffer (Tris/H₃BO₃ 5 mM, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.5 in CD experiments or Tris/HCl 10 mM, 1 mM EDTA, 0.025 M CF in leakage experiments) to give a final lipid concentration below 10 mM. After vortex mixing to produce multilamellar vesicles (MLVs), the mixtures were sonicated using a titanium tip sonicator (Virsonic Sonicator 475, Virtis Co, NY) under N₂ flux, in ice/water bath for 50 min, to produce SUVs for CD measurements, or 5 min to produce LUVs for leakage experiments. Titanium debris have been removed by centrifugation (Eppendorf table centrifuge, 5 min, 13,900 rpm). SUVs were used as obtained within the same day. LUVs were further extruded through two stacked 0.2 μ m polycarbonate films and separated from non-entrapped CF through gel filtration on a PD-10 disposable gel filtration column. LUVs were used within 48 h of preparation. The lipid concentration was determined by phosphorus analysis using the method proposed by Rouser et al. [20].

2.6. Circular dichroism (CD) measurements

CD spectra were measured over the range 190–250 nm, using a Jasco-710 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan) coupled to a Neslab RTE111 circulating water bath. The instrument was calibrated using *d*-10-camphorsulfonic acid. Spectra were obtained at 25 °C using cells with a path length of 0.5 cm. Peptides were dissolved in water and CD spectra were collected at 8.5 μ M concentration. Data points were recorded at a scan speed of 20 nm/min, bandwidth of 1.0 nm, 0.5 s response and 0.1 nm resolution. Three repeat scans were accumulated to make up the final averaged spectra. Following baseline correction, the observed ellipticity, θ (mdeg) was converted to mean residue ellipticity $[\theta]$ (deg cm²/dmol), using the relationship $[\theta] = 100\theta/(lcn)$ where “*l*” is the path length in centimeters, “*c*” is peptide millimolar concentration, and “*n*” the number of residues in the peptide. The α -helix fractions were determined as described previously [13].

2.7. Dye leakage

Aliquots of LUV suspension were added to 1 cm quartz cuvettes containing magnetically stirred peptide solutions to give a final volume of 1 ml. Release of CF from LUVs causes decrease in its self-quenching that was followed with a Hitachi Fluorometer F4500 (Tokyo, Japan) at 520 nm (excited at 490 nm) during 20 or 30 min for PCPG or PC LUVs respectively at 25 °C. 100% leakage (F_{100}) is determined by adding 20 μ l Triton X-100 10% solution. At regular intervals % leakage is calculated as $100 \times (F - F_0)/(F_{100} - F_0)$, where *F* is the measured fluorescence intensity and F_0 corresponds to the fluorescent intensity of intact LUVs.

2.8. Mast cell degranulation activity (β -hexosaminidase assay)

Mast cells were obtained by peritoneal lavage of large (>300 g) Sprague-Dawley rats. The mast cells were isolated from

containing cell types by centrifugation through a cushion of Percoll as previously described [8], washed twice by resuspension and centrifugation, and finally suspended in a HEPES buffer which comprised of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mg/ml BSA and 1 mg/ml glucose (pH 7.4).

RBL-2H3 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin solution. The cells were cultured in 96-well plate (5×10^4 cells/0.1 ml/well) in growth media in preparation for degranulation assay.

Degranulation was determined by measuring the release of the granule marker, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (β -hexosaminidase), which co-localizes with histamine, as previously described [8]. The cells were incubated with various concentration of the peptide for 15 min at 37 °C, and then the cells were quenched by addition of 0.15 ml of ice-cold HEPES buffer. After centrifugation, the supernatants were sampled for β -hexosaminidase assay. Briefly, 50 µl of samples of the medium and 50 µl of the substrate, 5 mM *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 0.2 M citrate, pH 4.5, were incubated in 96 well plates to yield the chromophore, *p*-nitrophenol. The absorbance of the colored product was assessed at 405 nm using a microtiter plate reader. The values for β -hexosaminidase released in the medium were expressed as the percentage of total β -hexosaminidase, which was determined in the cells lysed in 0.1% Triton X-100.

2.9. Hemolytic assay

Hemolytic assay was performed as previously described [18] with slight modification. Human blood was obtained from healthy donors at the Vital Brasil Hospital in Butantan Institute. Blood samples drawn to obtain erythrocytes for subsequent use as target cells were collected in anticoagulant (Alsever's old solution, containing, in mM, 114 citrate, 27 glucose and 72 NaCl, pH 6.1). Erythrocytes were washed three times, resuspended at 2% in PBS and incubated with sample for 30 min at 37 °C. Background or total cell lysis was evaluated by incubation of erythrocytes with PBS or Triton X-100 (0.5%), respectively. After incubation, unlysed cells were spun down and the absorbance of the supernatant was measured at 414 and 540 nm and expressed as percentage of lysis.

2.10. Antimicrobial activity (Determination of minimal inhibitory concentration, MIC)

The microorganisms used were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. saprophyticus* (clinical species), *S. epidermidis* (clinical species), *Bacillus subtilis* (CCT 2471), *B. thuringiensis* (wild species), *E. coli* (CCT 1371), *E. coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Proteus mirabilis* (clinical species), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

Serial dilution of peptide was prepared in sterilized water. Aliquots were placed in ELISA microplates containing Müeller-Hinton broth (Difco) in a final volume of 200 µl. The mixture was completed by inoculation of 10 µl of bacterial culture growing in logarithmic-phase of microorganism as monitored

by the UV absorbance at 600 nm. The final cells number (1×10^5 /ml) was determined by plate counting.

The plates were incubated at 35 °C and aliquots of 10 µl were removed both at the beginning of assay and after overnight incubation, and then plated in Müeller-Hinton agar. The number of colony-forming units was determined. The results were expressed as inhibition percentage of colony-forming units against a control; this control was obtained in each situation by counting the number of microorganisms introduced into the plate in the absence of peptide.

3. Results

3.1. Purification and sequence determination

The venom extracts of *E. rubronotatus* were subjected to reverse-phase HPLC, and the purity and complexity of each fraction was examined by MALDI-TOF MS. The HPLC profile was rather simple, giving only several intense peaks (Fig. 1A). The MALDI-TOF MS analysis revealed that the mass range for the components was up to *m/z* 5000. The major fraction eluted at 21.5 min showed high purity with a protonated molecular ion peak at *m/z* 1644.9 (MH⁺, monoisotopic, Fig. 1B). The molecular weight and chromatographic behavior suggested this component to be a peptide, which we designated eumenitin.

The sequence of the peptide was mostly analyzed by mass spectrometry together with Edman degradation. The MALDI-TOF MS analyses with the combined use of enzymatic ladder sequencing and CID/PSD spectra led to a full sequence [9]. Ladder sequencing of the purified peptide by carboxypeptidase Y (CPY) digestion showed the C-terminal sequence to be A-S-I/L-I/L-T. Similarly, ladder sequencing by aminopeptidase M (APM) digestion revealed the N-terminal sequence as I/L-N-I/L-K/Q-G-I/L-F. The sequence of unidentified residues with 355 mass units, was K/Q-K/Q-V according to the CID/PSD analysis of intact peptide and the ladder peptide lacking five C-terminal residues. Three K residues were revealed by the acetylation of the intact peptide leading to a mass shift of 168 mass units. L and I residues at the 3 and 6 positions were differentiated by *w* and *d* ions pattern. Thus, the peptide sequence I/L-N-L-K-G-I-F-K-K-V-A-S-I/L-I/L-T was deduced, which is consistent with the MH⁺ peak at *m/z* 1644.9. Edman degradation determined the remaining three I/L residues, and accordingly, the full sequence of eumenitin was determined to be L-N-L-K-G-I-F-K-K-V-A-S-I-L-L-T. The solid-phase synthesis of this peptide using Fmoc-L-amino acids and the HPLC comparison of the synthetic specimen with the natural peptide finally corroborated the sequence.

3.2. CD spectral analyses of secondary structure

The chemical features of eumenitin, rich in hydrophobic and basic amino acids with no disulfide bond, are characteristic of cationic linear amphiphilic peptides [2,7,24], in particular, quite similar to those of EMP-AF, a mast cell degranulating and antibacterial peptide, which we have recently found in another solitary wasp venom [12,21]. As shown in Fig. 2, these two peptides are highly homologous, but an important

	1	5	10
Anoplin	GLLKRIKTLL-NH₂		
EMP-AF	INLLKIAKGIKSL-NH₂		
Mastoparan	INLKALAALAKKIL-NH₂		
Eumenitin	LNLKGIFKKVASLLT		
	1	5	10 14

Fig. 2 – Amino acid sequences of anoplin, EMP-AF, mastoparan and eumenitin.

difference is that eumenitin is not amidated, but instead has one more amino acid residue (Thr) in the C-terminus.

This class of peptides has been known to adopt an amphipathic α -helical conformation, showing amphiphilic character under appropriate conditions. The amphipathicity in these peptides has been considered essential for their biological activities [16,23,27]. In fact, the sequence of eumenitin can be predicted to adopt an amphipathic α -helical conformation as depicted in Fig. 3. In this view, all the hydrophilic amino acid residues, K⁴, K⁸, K⁹, N², S¹² and T¹⁵, are located on one side, whereas the hydrophobic amino acid residues, L³, L¹³, L¹⁴, I⁶, F⁷, V¹⁰ and A¹¹, are on the other side of the helix. Consequently, eumenitin can be classified into cationic linear α -helical amphipathic peptides.

CD spectroscopic investigation of eumenitin in water and in Tris buffer, confirms the absence of secondary structure as seen in Fig. 4. However, in the presence of TFE (data not shown) or SDS the two negative dichroic bands, at 208 and 222 nm, indicate a significant amount of α -helical structure; spectra obtained in both environments are very similar. Table 1 summarizes data obtained in CD analysis of eumenitin in comparison with EMP-AF, another mastoparan-like peptide and correlate these data with their structural features, such as net charge (Q), mean hydrophobicity (H) and mean hydrophobic moment (μ).

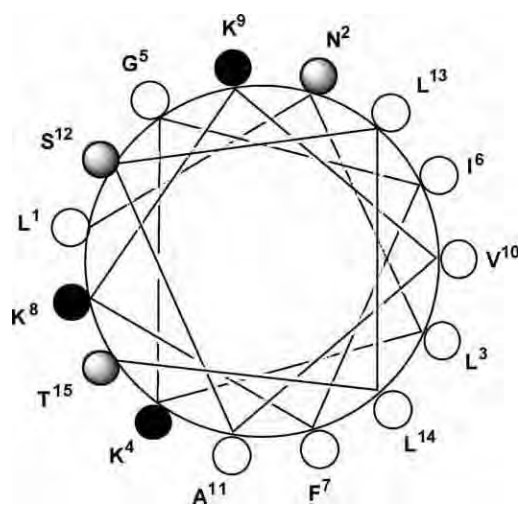


Fig. 3 – Predicted amphiphilic α -helical structure of eumenitin. In this perpendicular view of the helix, the hydrophilic Lys, Ser, Thr and Asn residues are located on one side and the hydrophobic Ala, Ile, Leu, Val and Phe residues on the other side of the helix.

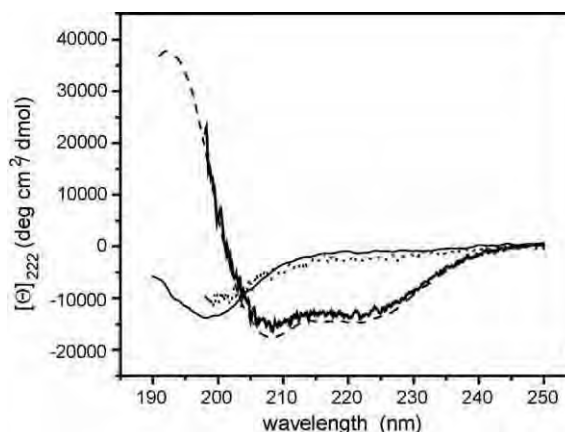


Fig. 4 – CD spectra of eumenitin (8.5 μ M) showing unordered conformations in water (—) and in the presence of 63 μ M PC (· · ·), and showing α -helical characteristic spectra in the presence of 8.0 mM SDS (- - -), and of 26 μ M PCPG (—).

In the presence of vesicles the conformation of eumenitin was shown to be dependent on the type of lipids used in the liposomes. Zwitterionic (PC) liposomes induce only a small change in the CD spectra of this peptide. At low peptide concentration (8.5 μ M), the α -helix fraction estimated was only slightly higher than that observed in buffer and even at higher peptide (22 μ M) concentration the helical fraction did not increase significantly (see Table 1). Anionic liposomes, however, induce higher amount of α -helix. The amount of α -helix induced in this peptide by PCPG liposomes is of the same magnitude order as observed with SDS above the critical micelle concentration (cmc). Moreover, higher lipid and peptide concentrations have induced considerable higher α -helical amounts, reaching 72% at 0.94 mM lipid concentration and 20 μ M eumenitin.

3.3. Lytic activity in liposomes

Dye release from anionic PCPG (70:30) or zwitterionic PC liposomes, due to the presence of different eumenitin concentrations, was monitored up to 30 min. These experiments showed that, in anionic vesicles, more than 90% dye was released in one minute using 4 μ M eumenitin. However, with zwitterionic liposomes, the same leakage level was achieved at a higher peptide concentration of 75 μ M and in 30 min contact time (Fig. 5), indicating a great preference for charged membranes. The expressive lytic activity observed in anionic liposomes in contrast to the much lower activity on the zwitterionic type has also been found in other mastoparan-like peptides as EMP-AFs and mastoparan-X [21,17]. A sigmoidal dependence of the dye leakage with the peptide concentration observed in anionic vesicles indicates a cooperative process, similar to that observed for other pore-forming peptides such as melittin and mastoparans [26,17]. In neutral vesicles the dose response curve evidences a low cooperative process. The critical peptide concentration (\sim 15 μ M) to induce leakage in these vesicles is much higher than that observed for anionic liposomes (\sim 1 μ M). These aspects evidence the great selectivity to anionic membranes.

Table 1 – Structural properties of eumenitin (8.5 μM) in comparison to EMP-AF (10 μM), and their α -helix fraction (f_H) in different conditions

	Net charge	Mean hydrophobicity	Mean hydrophobic moment	f_H			
	Q	H	μ	TFE ^a	SDS ^b	PCPG ^c	PC ^d
Eumenitin	+3	0.232	0.407	0.43	0.50	0.45/0.72	0.07/0.11
EMP-AF	+4	0.310	0.535	0.55	0.72	0.73	0.16

^a 40% TFE.
^b >8.0 mM SDS.
^c P/L ratio = 1:2.6 and 1:53.
^d P/L ratio = 1:6.3 and 1:38.
^e According to Eisenberg et al. (1984), normalized consensus scale [5].

3.4. Biological activities

The biological activities of eumenitin were investigated using the synthetic peptide. The results of the antimicrobial activity are summarized in Table 2. Eumenitin showed potent and broad-spectrum antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria to a similar extent. This profile is in contrast to that of EMP-AF, which is more selective to Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria [21].

Fig. 6 shows the results of the mast cell degranulation activity. As expected, eumenitin stimulated the degranulation both from the rat peritoneal mast cells and the RBL-2H3 cells, but the potency was much lower than that of mastoparan. It is also much lower than EMP-AF, since the potency of EMP-AF is comparable to that of mastoparan [12].

In human erythrocytes, eumenitin showed a very weak hemolytic activity, inducing only 20% of hemolysis at the extremely high concentration of 1 mM ($n = 3$, data not shown). This concentration is approximately 100–150 times higher than that used in antibacterial assay. In contrast, both mastoparan and EMP-AF have been reported to show significant hemolytic activity [12].

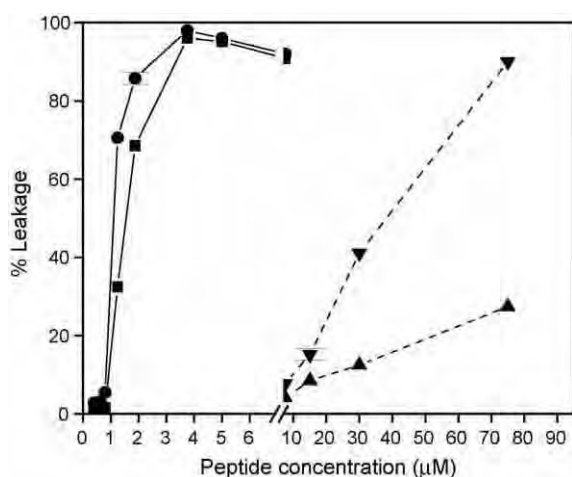


Fig. 5 – Leakage of the fluorescent probe CF from PCPG (left side, straight lines) and PC liposomes (right side, dashed lines) induced by eumenitin. Percent leakage was plotted within (■) 1 min. and (●) 3 min. in 60 μM PCPG (7:3), and within (▼) 1 min. and (▲) 30 min in 100 μM PC liposomes (1 μM = 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; error bars are relative to 5 repetitions).

Thus, in spite of having high homology, the biological activity profile of eumenitin was somewhat different from those of mastoparan and EMP-AF.

4. Discussion

We have isolated and characterized a new antimicrobial peptide, eumenitin, from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. Solitary eumenine wasps exclusively prey on caterpillars with their venoms, paralyzing the preys to feed their larvae. Therefore, we initially expected to find neurotoxins from this venom, but instead a major component was an antimicrobial peptide. Antimicrobial peptides are widely found in plants, insects, amphibians and mammals, playing an important role in innate immune systems and host defense mechanisms [1,2,7,27]. In most cases, the antimicrobial peptides are produced when challenged by microbes, but they are also present in arthropod venoms [15,24]; for example, lycotoxins in the venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis* [25] and IsCTs from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis* [3,4], and even in Royal Jelly of honey bees *Apis mellifera*, jelleines [6]. In case of solitary wasp venom, we have already found antimicrobial peptides from two species; EMP-AF from *Anterhynchium flavomarginatum micado* and anoplins from *Anoplus samariensis* [12,13,21]. Thus, our studies indicated that antimicrobial peptides might be widely contained in solitary wasp

Table 2 – Antimicrobial activity of eumenitin

Microorganism	MIC (μM)
Gram-positive	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	>60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6
<i>Staphylococcus saprophytius</i> (CS)	6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CS)	>60
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 2471	60
<i>Bacillus thuringiensis</i> (WT)	>60
Gram-negative	
<i>Escherichia coli</i> CCT 1371	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6
<i>Escherichia cloacae</i> ATCC 23355	>60
<i>Proteus mirabilis</i> (CS)	>60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	30

*MIC: Minimum inhibitory concentration.

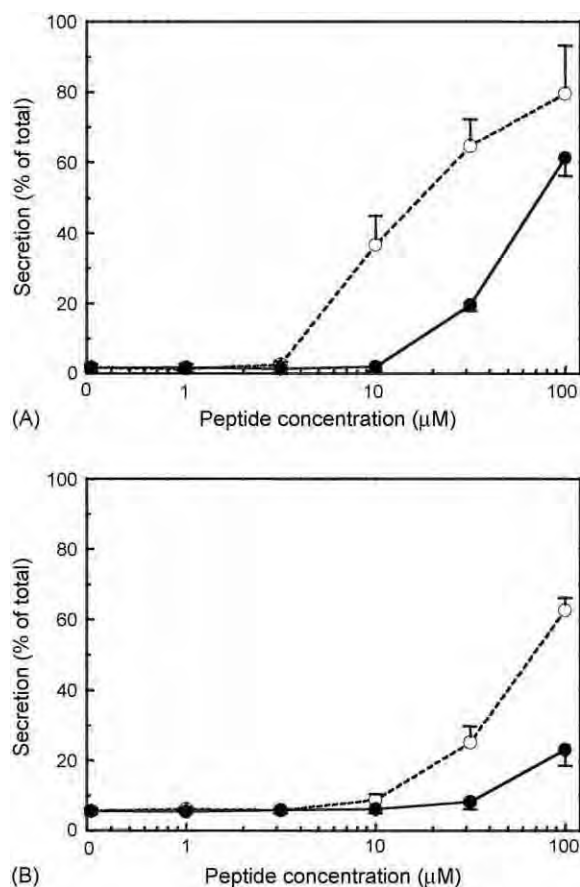


Fig. 6 – Degranulation activity in rat peritoneal mast cells (A) and RBL-2H3 cells (B). (●) eumenitin; (○) mastoparan (control). The activity was determined by measuring the release of the granule marker β -hexosaminidase which co-localizes with histamine, and the values for β -hexosaminidase released in the medium were expressed as the percentage of total β -hexosaminidase, which was determined in the cells lysed in 0.1% Triton X-100. Data are the mean \pm SEM ($n = 3$).

venoms, playing a role in preventing potential infection. However, they might play another role in the venom toxicity, which is remained to be investigated.

The amino acid sequence of eumenitin, rich in hydrophobic and basic amino acids with no disulfide bond, is characteristic of cationic linear α -helical amphipathic peptides, commonly found in other wasp venom peptides: mastoparan, EMP-AF, and anoplins. In fact, the CD spectra of eumenitin in TFE or in anisotropic membrane-mimicking environments, such as SDS and in anionic liposomes, showed a high content of α -helical conformation. However, in contrast to those mentioned wasp venom peptides, eumenitin is not C-terminally amidated, and instead, has an extra amino acid residue (Thr). We have studied the consequence of C-terminal amidation of EMP-AF by means of NMR and molecular dynamics, and concluded that the C-terminal amidation stabilizes the α -helical conformation, leading to the enhanced potency of biological activity through the cell membrane [22]. This study showed an extra hydrogen bond between the amide group in the C-terminus and the Ile¹¹

carbonyl group of the backbone. In addition to this stabilizing effect, the C-terminal amidation provides an extra electrical charge to EMP-AF. These factors are absent in eumenitin, which in consequence, has lower helical content than EMP-AF in anionic and zwitterionic liposomes.

The biological activity profile of eumenitin is somewhat different from that of EMP-AF in spite of having similar primary structures. Eumenitin shows antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria to a similar extent, whereas EMP-AF is rather selective to Gram-positive bacteria [21]. In mast cell degranulating activity, EMP-AF is much more potent than eumenitin. Eumenitin is virtually non-hemolytic, but EMP-AF is significantly active. The difference may, at least in part, come from the C-terminal structure, amidated or not, as discussed above. The comparison between these peptides, however, should take into account other structural features besides C-terminal amidation and electrical charges. These features are related principally to the average hydrophobicity and hydrophobic moment, since their polar faces are subtended by approximately the same angles. Eumenitin presents lower mean hydrophobic moment and mean hydrophobicity than EMP-AF (Table 1, [5]). These parameters would probably contribute to a lower helical content in zwitterionic vesicles and, more interestingly, to lower lytic activity in these vesicles. The lytic activity of eumenitin in liposomes is well correlated to their biological activities. The mast cell degranulating activity was shown to be dependent of membrane receptors [17,19,26]. The reduced mast cell degranulating activity in eumenitin suggests that the helical content and the helical macrodipole should be important factors in the mechanism of molecular recognition of peptide and mast cell receptors. The lytic experiments in zwitterionic liposomes suggest that the lower hydrophobicity and hydrophobic moment modulate the hemolytic activity.

Due to the drug-resistance by pathogenic bacteria, antimicrobial peptides have attracted much attention as a new type of antibiotics. Since the antimicrobial activity of these peptides is induced by the interaction with the cell surface membrane, drug-resistance would be hardly developed. The new peptide, eumenitin, may serve as not only a novel tool for investigating the mechanism of action of antimicrobial peptides, but also a lead for new antibiotic agents.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Sōichi Yamane (Ibaraki University) and Akira Endo (Ritsumeikan University) for the collection and identification of wasps and their invaluable discussions. This work was supported in part by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and a grant from the Research for the Future Program from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

REFERENCES

- [1] Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Int Med* 2003;254:197–215.

- [2] Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:169–84.
- [3] Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;286:820–5.
- [4] Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1514–22.
- [5] Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 1984;179:125–42.
- [6] Fontana R, Mendes MA, Souza BM, Konno K, César LMM, Malaspina O, et al. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004;25:919–28.
- [7] Hancock REW, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* 2002;206:143–9.
- [8] Hide I, Bennett JP, Pizzey A, Boonen GM, Bar-Sagi D, Gomperts BD, et al. Degranulation of individual mast cells in response to Ca^{2+} and guanine nucleotides: an all-or-none event. *J Cell Biol* 1993;123:585–93.
- [9] Hisada M, Konno K, Itagaki Y, Naoki H, Nakajima T. Advantages of using nested collision induced dissociation/post-source decay with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry: Sequencing of novel peptides from wasp venom. *Rapid Commun Mass Spectr* 2000;14:1828–34.
- [10] Kawai N, Konno K. Molecular determinants of two neurotoxins that regulate sodium current inactivation in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2004;361:44–6.
- [11] Konno K, Hisada M, Miwa A, Itagaki Y, Naoki H, Kawai N, et al. Isolation and structure of pompilidotoxins (PMTXs), novel neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:612–6.
- [12] Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N, Miwa A, et al. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a novel mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*. *Toxicon* 2000;38:1505–15.
- [13] Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta* 2001;1550:70–80.
- [14] Konno K, Kawai N. Pompilidotoxins. Novel peptide neurotoxins blocking sodium channel inactivation from solitary wasp venom. *Curr Med Chem - Central Nervous System Agents* 2004;4(2):139–46.
- [15] Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2651–68.
- [16] Matsuzaki K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462(1-2):1–10.
- [17] Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* 1996;35:8450–6.
- [18] Oliveira KC, Andrade RMA, Piazza RMF, Ferreira Jr JMC, Berg CW, Tambourgi DV. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 2005;45:421–9.
- [19] Ross EM, Higashijima T. Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. *Methods Enzymol* 1994;237:26–37.
- [20] Rouser G, Fleisher S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. *Lipids* 1970;5:494–6.
- [21] dos Santos Cabrera MP, Souza BM, Fontana R, Konno K, Palma MS, de Azevedo WF, et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Peptide Res* 2004;64:95–103.
- [22] Sforça ML, Oyama Jr S, Canduri F, Lorenzi CCB, Pertinez TA, Konno K, et al. How C-terminal carboxyamidation alters the mast cell degranulating activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. *Biochemistry* 2004;43:5608–17.
- [23] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462(1-2):55–70.
- [24] Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(11):494–6.
- [25] Yan L, Adams ME. Lycotoxins antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem* 1998;273:2059–66.
- [26] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 2001;81:1475–85.
- [27] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389–95.

Structure and lytic activity of Anoplin, a short chain antimicrobial peptide from solitary wasp venom

Marcia Perez dos Santos Cabrera^a, cabrera.marcia@gmail.com

Sabrina Thais Broggio^a, sabroggio@yahoo.com.br

Maurício L. Sforça^{b,1}, sforca@click21.com.br

Katsuhiko Konno^c, kk-gon@butantan.gov.br

Mario Sérgio Palma^d, mspalma@rc.unesp.br

Valmir Fadel^a, valmir@ibilce.unesp.br

Walter F. de Azevedo Jr.^{a,c,2}, walter.junior@puccr.br

Thelma A. Pertinhez^{b,3}, thelma@unipr.it

Alberto Spisni^{b,e,3}, aspin@unipr.it

José Roberto Ruggiero^a, zerug@ibilce.unesp.br

João Ruggiero Neto^{a,c,*}, joao@ibilce.unesp.br

^aDepartment of Physics, IBILCE, UNESP, R: Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 S. José do Rio Preto, SP, Brazil.

^bCeBiME, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, C.P. 6192, 13084-971 Campinas, SP, Brasil.

^cCAT CEPID, Center for Applied Toxinology, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 - CEP 05503-900 São Paulo, SP, Brazil.

^dCenter of Study of Social Insects, Department of Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

^eDepartment of Experimental Medicine, Sect Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Italy.

*Corresponding author. Tel. +55 17 3221 2248, Fax: +55 17 3221 2247

e-mail address: joao@ibilce.unesp.br

Present address: ¹

² PUCRS-Faculdade de Biociências, Av. Ipiranga, 6681. 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

³Department of Experimental Medicine, Sect Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Italy.

Abstract

In this work we studied the mode of action of Anoplin, an antimicrobial, helical decapeptide from wasp venom. We related its lytic activity on vesicles with the structures determined by NMR in SDS micelles and by Molecular Dynamics Simulations (MD) in TFE/water mixtures. We have searched the correlation between the lytic activity and structural parameters. We propose to estimate parameters as the angle subtended by the polar face and the hydrophobic moment of the helical stretch from NMR and MD structures. The solvation profile due to amphipathic molecules around the hydrophobic and charged groups of these peptides has also been analyzed. This analysis has shown that this procedure helps to establish part of the searched correlations, however the unusual behavior observed for the carboxylated form of the peptide, specially in its lytic activity in highly charged vesicles, can not be well understood at the moment with the present data.

Key words

Antimicrobial peptide, wasp venom, NMR structure, Molecular Dynamics, polar angle

Abbreviations

Circular Dichroism, CD; Molecular Dynamics, MD; critical micellar concentration, cmc; large unilamellar vesicles, LUVs; small unilamellar vesicles, SUVs; sodium dodecyl sulfate, SDS; trifluoroethanol, TFE; Phosphate: Borate: Citrate buffer, PBC buffer; carboxyfluorescein, CF; L- α -phosphatidylcholine, PC; L- α -phosphatidyl-DL-glycerol, PG; cardiolipin, CL; Simple Point Charge, SPC; α -helix fraction, f_H ; lipid to peptide ratio, Lip/Pep; root mean square fluctuation, RMSF; run integration number, RIN.

1. Introduction

The decapeptide Anoplin (ANP), GLLKRIKTLL, is among the smallest naturally occurring antimicrobial peptides. The amidated C-terminus form (ANP-NH₂), isolated from the venom sac of pompilid wasps *Anoplius samariensis*, presents antimicrobial and mast cell degranulating activity, being non-hemolytic [27]. Its synthetic C-terminus carboxylated analog, Anoplin-OH (ANP-OH) is also non hemolytic and lost the antimicrobial and mast cell degranulating activities. These results made us believe that the biological activity is centered in the membrane lipids. The outer leaflet of the bacterial membrane is, in general, negatively charged while in mammals it is electrically neutral [30]. Cationicity and amphipathic character of most antimicrobial peptides emphasize the importance of the electrostatic interaction to drive contacts with vesicles or cells, and to modulate binding forces and subsequent activity. Previous results [27, 23] have also suggested that, besides the peptide net charge, the primary sequence and probably the secondary structure adopted upon contact with biological membranes are very important to modulate its biological activities.

Since the unique difference between these peptides is the nature of the C-terminus we studied the lytic activity of Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH through dye leakage experiments of charged and non-charged vesicles. We related these results with their structures in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles and TFE/water mixture obtained by NMR and molecular dynamics (MD) simulations respectively. The aim of the MD study was to compare the conformational changes that occur when both peptides are submitted to a non-charged environment, with amphipathic characteristics, like mixtures of trifluoroethanol and water (TFE/water). Circular dichroism (CD) complemented the conformational analysis, also in the presence of zwitterionic and anionic vesicles. We have searched correlations between the lytic activity of both peptides in vesicles and their net charge, α -helical content and the angle subtended by the polar face. Instead of using the helical wheel projection, we propose to estimate the polar angle and the hydrophobic moment of the helical stretch obtained from NMR and MD structures in SDS and TFE/water respectively. We have also searched for water and TFE clusters around the hydrophobic and charged groups of these peptides. It has been shown, in the last ten years, that permeabilization efficiency is, in general, correlated with some physicochemical characteristics of antimicrobial peptides [11,14, 12], such as: net charge [13], hydrophobicity [44], helicity, hydrophobic moment and the angle subtended by the polar face [42, 45]; and also to the characteristics of the bilayer as compressibility and bending modulus and spontaneous curvature radius [1, 28, 31].

2. Materials and methods

2.1 Peptide synthesis and purification

The peptides were synthesized as described by Konno et. al. [27] by step-wise manual solid-phase synthesis using N-9-fluorophenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. The crude products were purified by reverse-phase HPLC, and the homogeneity and sequence were accessed by analytical HPLC and mass spectrometry (MALDI-TOF-MS and ESI-MS).

2.2 Vesicle preparation

Lipids and carboxyfluorescein (CF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Zwitterionic lipid film composed by pure L- α -phosphatidylcholine (PC) and negatively charged lipid mixtures made of PC and either L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) or cardiolipin (CL) have been prepared at the following molar ratios: PCPG 70:30, PCPG 40:60, PCCL 70:30 and PCCL 40:60. Small unilamellar vesicles (SUVs) for CD measurements and large unilamellar vesicles (LUVs) for dye leakage measurements have been prepared as detailed described elsewhere [18]. Shortly, lipid films were hydrated either with Tris/H₃BO₃ 5 mM, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7.5 for CD experiments, or Tris/HCl 10 mM, 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, pH 7.5, containing 25 mM CF for fluorescence experiments. 50 min sonication for CD measurements and 5 min for fluorescence measurements produced respectively SUVs or LUVs, which have been used respectively within 24 hours and 48 hours of preparation. The lipid concentration was determined by phosphorus analysis [39].

2.3 Circular dichroism measurements

CD spectra were measured at several peptide concentrations either in 1 mM PBC buffer, pH 7.5, or in buffered sodium dodecylsulfate (SDS) solution above the critical micellar concentration (cmc) at 8 mM, with and without the adding of 150 mM NaF, or in the presence of anionic PCPG 70:30 SUVs. The measurement was carried out over the range of 198-260 nm, using a Jasco-710 spectropolarimeter (Tokyo, Japan). The instrument was calibrated using d-10-camphorsulfonic acid. Spectra have been acquired at 25°C using 0.5 cm path length cell, and averaged over six scans; measurement parameters, baseline correction and ellipticity calculation

as indicated elsewhere [18]. Assuming a two state model the observed mean residue ellipticity at 222 nm (Θ_{222}^{obs}) was converted into α -helix fraction (f_H) using the method proposed by Rohl and Baldwin [38] and previously described [27].

2.4 NMR spectroscopy and molecular modelling

The samples for NMR measurements were prepared by dissolving the peptides in a 200 mM SDS perdeuterated aqueous solution containing 5% of D₂O to yield a concentration of 0.8 mM, pH= 4.5. All two dimensional ¹H-NMR experiments were carried out on a Varian Unity 500 spectrometer operating at 499.730 MHz for ¹H frequency, at a temperature of 30 °C. To assign the peptide resonance peaks, standard methods were used including Double Quantum-Filtered (DQF)-COSY, Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) and Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY) experiments. The TOCSY spectra were acquired using a DIPSI spin-lock sequence at a field strength of 10 kHz and spin-lock evolution time of 85 ms. NOESY spectra with 200 and 300 ms mixing time were recorded. All two-dimensional experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the method States et. al [41]. The spectra width was typically 6000 Hz and 512 τ_1 increments with 56 transients of 2048 complex points for each free induction decay were recorded, except for DQF-COSY, which 1024 τ_1 experiments were collected each with 40 transients of 8192 complex points.

Data were processed on a Silicon Graphics Octane workstation using the nmrPIPE/nmrVIEW [16] Software. To obtain distance constraints, cross-peaks volumes were estimated from the 300 ms NOESY spectra. The NOE calibration was made using the Median Methods in the NMRVIEW software. The lower bound were set to 1.8 Å.

The 3D structure of ANP-NH₂ and ANP-OH was computed using the simulated annealing methods [21] in the DYANA refine module, and energy minimized by using the DISCOVER (BYOSYM Technologies Inc., San Diego, CA.) software package, together with the INSIGHT II [24] as graphic interface.

2.6 Dye Leakage

A volume of fresh LUV suspension was injected into a cuvette containing magnetically stirred peptide solutions either at 5.0 or at 20 μ M, to give a final volume of 1.0 ml. These peptide concentrations represent the range of interest as determined in previous antimicrobial activity tests [27,23]. CF release from the vesicles was monitored at 520 nm (excited at 490 nm) on a Hitachi Fluorometer F4500 (Tokio, Japan) by measuring the decrease in self-quenching at 25°C. Percent of dye leakage was determined after regular time intervals, and calculated as indicated

in dos Santos Cabrera et al. [18]. 100 % leakage fluorescence has been corrected for the corresponding dilution factor.

2.7 MD simulations

MD simulations of the peptides were carried out in a triclinic box containing trifluoroethanol (TFE) in water (~ 30% v/v). Systems were made up of 205 TFE molecules, 1902 water molecules and 4 chlorine (Cl⁻) counterions, which neutralize 4 positive charges in ANP-NH₂, and 3 Cl⁻ counterions, which neutralize ANP-OH net charge. In both cases the N-termini were treated as a positively charged group (NH₃⁺); ANP-OH C-terminus was treated as a carboxylated group, negatively charged (COO⁻). The calculations were carried out using GROMOS 96 force field [43]; model SPC (Simple Point Charge – [6]) was used for water; for TFE molecules, the model and simulations conditions were applied as proposed by Fioroni et al. [19]. Systems optimization was carried out in 8000 steps conjugate gradient and a steepest descent cycle was performed every 500 steps. Position restriction dynamics, for solvent and ions relaxation ran for 1 ns, with a 2 fs-time step for the integration of movement equations. Afterwards constraints have been removed and the systems underwent 8 ns of MD simulations. Periodic boundary conditions have been imposed in the systems simulations with a cutoff radius of 1.4 nm. The LINCS [22] algorithm was used to constraint all bond lengths and SETTLE [35] to constraint water geometry. Simulations ran in the canonical ensemble (n, P, T) 300 K and 1 atm. Temperature and pressure were modulated using coupling techniques [4] with coupling and isothermal compressibility constants of 0.01 ps (solvent and peptide) and 6.5 x 10⁻⁵ bar⁻¹, respectively. Long range electrostatic interactions were treated using Particle Mesh Ewald method [10,8]. For Lennard-Jones interactions the cutoff radius was 1.4 nm. The atomic positions were recorded every 1.0 ps throughout each trajectory. MD calculations and trajectory analysis were made using the facilities of the GROMACS package [29].

The strategy for the MD studies of ANP-NH₂ and its analogue in TFE/water mixture (70:30 v/v) was to use the one of the 20 structures determined from NMR experiments with ANP-NH₂ in SDS. Two 8 ns MD simulations have been carried out: in the first, we kept the original C-terminus amidated chain and in the second, only the C-terminus had the amide group extracted, remaining a negatively charged carboxyl group; this strategy allows for a clearer visualization of the conformational changes induced by the environment substitution.

3. Results

3.1 CD spectroscopy

CD experimental results are summarized in Table 1. It shows that in water or PBC buffer at physiological pH, and zwitterionic vesicles ANP-NH₂ and ANP-OH are random coil. In 30% TFE/water, SDS micelles and anionic phospholipid vesicles, both the amidated and carboxylated forms of the peptide showed CD spectra with two negative dichroic bands centered at 208 and 222 nm, characteristic of helical structure. The higher α -helix fractions determined are 24% in 30% TFE, 30% in buffered SDS 8 mM, 28% in PCPG 7030 for the amidated form, while for the carboxylated form, they were smaller just in 30% TFE. These results are in good agreement with previous ones [27]. The α -helix fractions were approximately independent of the peptide concentration in TFE and SDS ruling out any aggregation process in those environments.

However, when checking the concentration dependence of the helical content in PCPG 7030 vesicles, we found out that the α -helical content of ANP-NH₂ varies with the lipid to peptide molar ratio (Lip/Pep) until the ratio of 25:1, suggesting lower binding levels of the peptides to these vesicles.

3.2 NMR Spectroscopy

Sequential resonance assignments was performed based on the combined use of two dimensional TOCSY and NOESY.

The $^3J_{\text{NH}\alpha}$ -coupling constants were estimated from the residual intensity of the antiphase cross-peak in the DQF-COSY experiment and the chemical shifts for all residues together with the NH- α CH coupling constants ($^3J_{\text{HN}\alpha}$). Figure 1 displays the plot of the residual chemical shifts deviations for the α -protons resonances. As can be seen, from residue L2 to L9, they are all negative and intense, at least between residues 2 to 8, for ANP-NH₂, thus suggesting the existence of a helical segment extending over this region. In the case of ANP-OH this is true from residues 2 to 7.

The summary of the interresidue NOEs for the peptide is reported in Figure 2. In fact, the medium range (i,i+3) and (i,i+4) NOEs together with the intense NH-NH (i,i+1) indicate an helical folding spanning residues 3 to 10, for the ANOPLIN-NH₂ and 2 to 10 for the ANOPLIN-OH.

3.3 Molecular Modeling

A total of 135 distance constraints containing 25 medium range constraints were collected and taken into account for structure calculation using DYANA [21]. The calculation with the carboxylated peptide used 128 distance constraints with 25 medium range constraints.

Out of 100 structures that were generated, 40 structures based on the minimum target function ($0.13 \pm 0.02 \text{ \AA}^2$ for ANP-NH₂ and $0.27 \pm 0.02 \text{ \AA}^2$, for ANP-OH) were energy minimized using the DISCOVER program. After minimization, 20 structures were selected based on the low residual distance violation of backbone showing a RMSD for all residues equal to $0.14 \pm 0.06 \text{ \AA}$ for ANP-NH₂ and $0.18 \pm 0.08 \text{ \AA}$ for ANP-OH and were used to represent the solution three-dimensional structure of the peptides in 200 mM SDS at 30°C and pH 4.5 as shown in Figure 3. Table 2 shows the statistic results of RMSD and PROCHECK-NMR showing 100% of the PHI and PSI angles are in the most favored region.

3.4 Leakage experiments

The membrane permeating activity induced by ANP-NH₂ and ANP-OH was investigated through the release of CF from zwitterionic PC, and the anionic PCPG (70:30 and 40:60) and PCCL (70:30 and 40:60) LUVs.

Both peptides at 5 μM and until 20 min contact time induced less than 10% CF release from PC and from all anionic vesicles tested (data not shown). Even when the peptide concentration was increased to 10 μM for PC vesicles and 20 μM for anionic vesicles, the dye released fraction did not increase significantly within 5 minutes, as displayed in Figure 4a; due to this low lytic activity it was not possible to establish if there is some kind of cooperativity in the dose response curve. Exception is made to PCPG 4060 vesicles, displayed in Figure 4b, whose lytic activity is indicative of a cooperative process. The example shown in detail of Figure 4b was obtained with 120 μM PCPG 4060 and 20 μM peptide concentration. The low leakage efficiency observed for both peptides in anionic vesicles and even in PCPG 4060 at 5 μM peptide concentration could not be attributed just to the peptide's length. Other short chain antimicrobial peptide studied in our group (dos Santos Cabrera, PhD thesis, 2006), like the less charged undecapeptide Decoralin (SLLSLIRKLIT), presents high permeabilizing efficiency in PCPG 7030 vesicles. Nevertheless, the increase of PG or CL ratio in the vesicles composition, which increases the negative charge density, is directly related to the leakage increase. It should be noted that cardiolipin (CL) is a dimeric form of phosphatidylglycerol, with four acyl chains and two negative charges, one at each phosphate group.

3.5 Molecular dynamics simulations and trajectory analysis.

Figure 5 shows the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot for both peptides, i.e., how much each residue of the average structure deviates from the starting structure. ANP-NH₂ keeps the initial helical structure with a slight displacement of some residues at the N- and C-terminus. Its analogue, ANP-OH, undergoes a marked conformational change during the initial 400ps, with a significant decrease of its helical content at the residues 8, 9 and 10; the starting α -helix comprised residues Leu 3 to Leu 10 and it rapidly changed to Leu 2 till Lys 7. These conformational changes are well correlated with the helical content differences already found in NMR and CD experiments and with the abolishment of the biological activities of Anoplin-OH.

Analyzing the hydrogen bonding characteristic of α -helix in ANP-NH₂, we observed that the distance of 0.3 nm between the electronegative atoms involved is maintained throughout the MD simulations, except that between O from Gly 1 and N from Arg 5. The hydrogen bond between the O from Lys 7 and the NH₂ of the C-terminus, on the other hand, fluctuates, forming and breaking along the dynamics. However, the average values for the dihedral (ϕ , ψ) angles of residues 7, 8 and 9 remain within the α -helix favorable region, evidencing small distortions of helical structure commented above.

The NMR chain structures of both peptides show an amphipathic α -helix with the polar face subtending an angle of approximately 70° for the amidated peptide and 110° for the carboxylated form. This angle is centered in the helix axis and defined by the charged groups of the residues, located at the hydrophobic-hydrophilic interface. Although ANP-NH₂ maintains the starting helical conformation throughout the MD simulations in TFE/water, we found out that the side-chains of the charged residues are placed at different positions on the polar face, which increased the polar angle to approximately 160° (Figure 6a). The polar face of ANP-OH is rather different due to the unfolding of a significant portion of the helical C-terminus, that moved residues Leu 9 and Leu 10 to the polar face of the peptide structure and subtending an angle of 170° as displayed in Figure 6b. The estimate of these angles has been obtained from the average structure of the final 3 ns of the simulation time.

Integrating the pair radial distribution function (RDF), $g(r)$, from 5 to 8 ns time interval, we obtained the running integration number (RIN), $n(r)$, that indicates the number of molecules around a certain atom or group previously selected. We have chosen the center of mass of the Fluor atoms of TFE (F) and water (W) for the apolar and polar parts of the solvent, respectively. This analysis has been used to look into the distribution of water and TFE molecules around the peptide chains and build up a scenery of their preferences in an uncharged environment.

Figure 7 shows the solvation profile found around N- and C- termini. The positively charged N-terminus is equally solvated for both peptides, i.e., the number of water molecules is greater than the number of TFE molecules at the same radius (Figure 7, panel a). This finding agrees with the fact that the N-terminus is unfolded for both peptides, presenting larger

conformational freedom. It is exposed to the bulk solvent, as either indicated by the NMR results obtained in SDS micelles or the MD results obtained in TFE/water mixtures. Figure 7, panel b, displays the solvation analysis of the C-termini of ANP-NH₂ and ANP-OH. Considering the radius between 0.25 and 0.3 nm, there are 4-fold more water around the carboxyl group of ANP-OH (negatively charged) than around the amide group (polar, positive) of ANP-NH₂.

Residues Leu 9 and Leu 10 have been selected among hydrophobic residues to look into their solvation differences, due to the marked conformational transition they undergone, when comparing MD final chains for ANP-NH₂ e ANP-OH (Figures 4 and 5). These simulations show that Leu 9 kept its position at the hydrophobic-hydrophilic interface in ANP-NH₂ while it moved to the polar region in ANP-OH. Figure 7a displays RIN for Leu 9, which is the same for both peptides, despite of the conformational changes. F and W numbers are coincident, however if we take into account that the volume occupied by one TFE molecule is equivalent to the volume of 4 water molecules, we can assume that solvation by TFE prevails at the end of the side-chain. Leu 10 is kept at the center of the hydrophobic face in Anoplin-NH₂, and its solvation profile is in accordance with its location, as presented in Figure 7b, since the RIN of TFE prevails. Contrasting, ANP-OH is predominantly surrounded by water molecules (Figure 7c), corresponding to the final Leu 10 location in the hydrophilic face.

Considering the positively charged residues (Lys 4, Arg 5 and Lys 7) and the polar residue, Thr 8, RIN curves have been examined and are similar to each other and also between both peptides, showing the relative abundance of water molecules at 10:1 ratio at 0.4 nm radius. No hydrogen bonding has been found among side chains of charged and polar residues and among these residues and the backbone of both peptides, emphasizing the environment influence as the determinant of the secondary structure.

Table 3 summarizes the structural characteristics of ANPs, as obtained from calculations based on NMR and MD data. Using the program HELANAL [3] applied to the coordinates of NMR and MD structures, the average twist angle has been calculated. It was then used in the hydrophobic moment calculation, according to Eisenberg consensus scale [17], considering the helical stretches obtained for each peptide in the charged and non-charged mimetic environments. The highly anionic charged environment deviated the twist angle to values above the theoretical of 100°, elongating the helix and the non-charged TFE environment caused the opposite effect. These differences caused an increase in the hydrophobic moment in relation to the theoretical value of 0.366 for both peptides in both conditions tested. Also the size of the helical stretch seems to have reduced influence on the antimicrobial and hemolytic activities of both peptides.

4. Discussion

CD results have shown that the amount of helical structure found for anoplin and its carboxylated analogue is strongly dependent on the environment as had been observed for other antimicrobial peptides[.]. While in buffer and in zwitterionic vesicles the α -helix fraction is very low; in the presence of TFE or anionic micelles or vesicles this fraction increases being proportional to the amount of charged groups in the case of anionic environment. The SDS micelles provides to ANP-NH₂ strong electrostatic interaction at the micelle surface, near the charged head groups of SDS, with minimal spatial separation of its three negatively charged residues and the charged N-terminal, forming symmetrical and well defined structures (Figure 3). In these structures the hydrophobic groups could be hidden from the hydrophilic environment, i.e., inside the micellar core [7]. This condition might equally stabilize both forms of the peptide in a highly helical amphipathic structure.

Besides the effect of charged groups, the potential of the peptide to adopt helical conformation is dependent also on the individual helix propensities of the residues in a given environment [18, 7, 15, 38]. All the residues that compose these peptides have been shown to present higher helical propensities in TFE, SDS micelles and anionic phospholipid vesicles [7]. Anoplin and its carboxylated analog, in SDS solution and in PCPG 7030 vesicles, both at buffered pH 7.5, presented lower helical content as determined in CD experiments, in relation to that found in NMR and also in the MD studies. A similar apparent discrepancy was reported by Sforça et al. (2004) for EMP-AF [40] and by Chuang et al. (1996) for MP-B [9]: they also found a significantly lower helical content through CD than through NMR in 40% TFE.

The MD simulations carried out in a hydrophobic solvent (TFE/water) with Anoplin-NH₂ showed the presence of clusters of TFE around the peptide. The clusters are near the hydrophobic face in very good agreement with the results obtained by Johnston et al. [26]. The solvation profile showed the withdrawal of water molecules from the backbone and from the hydrophobic region. The hydrogen bonds between the backbone atoms are protected from water competition and the hydrophobic region remains clustered by TFE molecules (Figure 6, panels a and b), thermodynamically favoring the α -helix. Although the helical structure is maintained, the charged groups are mutually repelled. It is important to emphasize the dependence of the polar angle with the environment. For Anoplin-NH₂ this angle is $\sim 70^\circ$ and $\sim 160^\circ$, obtained, respectively, from NMR structure in micellar SDS and from MD simulations in 30% TFE. The presence of a negative charge at the C-terminus in Anoplin-OH introduces repulsive interactions with negatively charged SDS micelles and makes its polar face broader ($\sim 110^\circ$ and $\sim 170^\circ$) than that of the amidated form of the peptide.

In hydrophobic environment (TFE) which should be more similar to zwitterionic vesicles, the polar face broadens and leakage experiments in these vesicles showed higher dye release compared to that observed for mildly charged ones (PCPG70:30). Similar results have

been obtained by Wieprecht et al. (1997) [45] in PC vesicles; they found out that peptides with larger polar angle (140° - 180°) are more active than those with smaller polar angle (80 - 120°). Surprisingly, for anoplins, we did not observe the same correlation between helical fraction and lytic efficiency as observed for other peptides. PC vesicles do not induce helical conformation, although some leakage has been observed, while in PCPG (70:30) the peptide is more structured but with lower leakage. We have observed, however, that the carboxylated form is more efficient in the lysis of neutral vesicles which correlates well with the observation from the MD simulations that the polar angle is larger than that found for its amidated form.

Considering that the anionic vesicles studied provide less negatively charged environments than SDS, but more charged than TFE/water, we could expect that the polar angle in these environments would approximately vary within the range from $\sim 70^{\circ}$ to $\sim 160^{\circ}$ for Anoplin-NH₂ and within 110° to 170° for Anoplin-OH. Both forms of the peptide presented lower permeabilizing efficiency on anionic PCPG 7030 than in neutral PC vesicles. However when the amount of charged groups increased by substitution of PG by cardiolipin (30%) or increasing PG ratio to 60% the lytic activity has increased. Despite of the higher amount of anionic groups in PCCL vesicles, leakage from these vesicles was also not expressive; this could be due to cardiolipin, which is known to induce negative spontaneous curvature on bilayers [1], acting contrarily to cationic peptides that induce positive curvature. Interestingly this data emphasizes the importance of membrane curvature for leakage similar to what is observed for a pore forming peptide.

A comparison of the lytic activities of both forms of the peptide in anionic vesicles PCPG (40:60), however, shows an unexpected result. The less charged peptide, the carboxylated form, is more efficient than the amidated one. For other lytic peptides, with similar physico-chemical characteristics the C-terminus amidation contributes not only with the extra charge but also stabilizes the helical conformation. These features, in association with a narrow hydrophilic face, have been shown to contribute for higher lytic activity in anionic vesicles [.,]. Consequently, for the carboxylated form, one would expect reduced dye release from anionic vesicles. This unexpected behavior in the leakage of anionic vesicles can not be attributed to the anoplin chain length. We have observed that the amidated form of an undecapeptide is much more efficient in dye release from anionic vesicles than the carboxylated form (manuscript in preparation). Notwithstanding the reduced lytic activity of the amidated form in anionic vesicles it presents antimicrobial activity comparable to peptides whose mode of action supports the toroidal pore model [47]. These results suggests that the presence of lipopolysaccharides in the microbial membrane is important to the high antimicrobial activity of anoplin-NH₂ is good agreement with the observations for other peptides [42, 36]. In the same way, although these peptides are not hemolytic, the correlation between PC vesicles permeabilization and hemolysis has to take into account that the cholesterol content in erythrocytes increases the stability of

membranes and hampers its permeabilization [34]. Other non-hemolytic peptides like magainin and PGLa also permeate PC vesicles [42].

Acknowledgements

References

- [1] Allende D, Simon SA, McIntosh TJ. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys J* 2005;88:1828-37.
- [2] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998;47:415-33.
- [3] Bansal M, Kumar S, Velavan R. HELANAL - A program to characterize helix geometry in proteins. *JBSD* 2000;17:811-19.
- [4] Bárány-Wallje E, Keller S, Serowy S, Geibel S, Pohl P, Bienert M, Dathe M. A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. *Biophys J* 2005;89:2513-21
- [5] Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren W, Di Nola A, Haak JRJ. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684-90
- [6] Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B, editor. *Intermolecular Forces*, Dordrecht, The Netherlands: Reidel Publishing Co, 1981, 331-42.
- [7] Blondelle SE, Forood B, Houghten RA, Pérez-Payá E. Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. *Biopolymers* 1997;42:489-98.
- [8] Cheatham TE III, Miller JL, Fox T, Darden TA, Kollman PA. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular system: The Particle Mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins. *J Am Chem Soc* 1995; 117:4193-94.
- [9] Chuang CC, Huang WC, Yu HM, Wang KT, Wu SH. Conformation of *Vespa basalis* Mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 1996;1292:1-8.
- [10] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-92.
- [11] Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:71-87.
- [12] Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta* 2002;1558:171-86.
- [13] Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of Magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 2001;501:146-50.
- [14] Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, Beyermann M, Bienert M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 1997;403:208-12.
- [15] Deber CM, Li SC. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* 1995;37:295-318.
- [16] Delaglio F, Grzesiek S, Vuister, GW, Zhu, G, Pfeifer, J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 1995;6:277-93.
- [17] Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 1984;179:125-42.
- [18] dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Fontana R, Konno K, Palma MS, de Azevedo Jr, WF, Ruggiero Neto, J. Conformation and lytic activity of Eumenine Mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Peptide Res* 2004;64:95-103.
- [19] Fioroni M, Burger K, Mark AE, Roccatano D. A new 2,2,2-trifluoroethanol model for molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2000;104:12347-54.
- [20] Giangaspero A, Sandri L, Tossi A. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides – A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur J Biochem* 2001;268:5589-5600.
- [21] Güntert P, Mumenthaler C, Herrmann T. *DYANA User's Manual*, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Zürich, Switzerland; 1998.
- [22] Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGE. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 1997;18:1463-72.

- [23] Ifrah D, Doisy X, Ryge T S, Hansen PR. Structure-activity relationship study of anoplín. *J Peptide Sci* 2005;11:113-21.
- [24] INSIGHT II User Guide version 95, Byosim Technologies, San Diego; 1995.
- [25] Johnston JM, Cook GA, Tomich JM, Sansom MSP. Conformation and environment of channel-forming peptides: a simulation study. *Biophys J* 2006;90:1855-64;
- [26] Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N, Miwa A, Yasuhara T, Morimoto Y, Nakata Y. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicol* 2000;38:1505-15.
- [27] Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, Miwa A, Kawai N, Nakata Y, Yasuhara T, Ruggiero Neto J, Azevedo Jr, WF, Palma MS, Nakajima T (2001) Anoplín, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta* 2001;1550:70-80.
- [28] Lee MT, Hung WC, Chen FY, Huang HW. Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation. *Biophys J* 2005;89:4006-16.
- [29] Lindahl E, Hess B, van der Spoel D. Gromacs 3.0: a package for molecular simulations and trajectory analysis. *J Mol Model* 2001;7:306-17.
- [30] Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense ? *Biochem Soc Trans* 2001;29:598-601.
- [31] Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, Epanand RM. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by Magainin 2. *Biochemistry* 1998;37:11856-63.
- [32] Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* 1996;35:8450-56.
- [33] Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, Magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* 1995;34:6521-26.
- [34] McIntosh TJ. The 2004 Biophysical Society-Avanti Award in Lipids address: roles of bilayer structure and elastic properties in peptide localization in membranes. *Chem Phys Lip* 2004;130:83-98.
- [35] Miyamoto S, Kollman PA. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem* 1992;13:952-62.
- [36] Papo N, Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes ? *Peptides* 2003;24:1693-1703.
- [37] Park NG, Yamato Y, Lee S, Sugihara G. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. *Biopolymers* 1995;36:793-801.
- [38] Rohl CA, Baldwin RL. Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods in Enzymol* 1998;295:1-26.
- [39] Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970;5:494-6.
- [40] Sforça ML, Oyama Jr. S, Canduri F, Lorenzi CCB, Pertinhez TA, Konno K, Souza BM, Palma MS, Ruggiero Neto J, de Azevedo Jr. WF, Spisni A. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. *Biochemistry* 2004;43:5608-17.
- [41] States DJ, Haberkorn RA, Ruben DJ. A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J. Magn Reson* 1982;48:286-92.
- [42] Uematsu N, Matsuzaki K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys J* 2000;79:2075-83.
- [43] van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krüger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG. Biomolecular simulation: The GROMOS96 manual and user guide; vdf Hochschulverlag: ETH Zürich, Switzerland, 1996.
- [44] Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* 1997;36:6124-32.
- [45] Wieprecht T, Dathe M, Epanand RM, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 1997;36:12869-80.
- [46] Wishart DS, Sykes BD, Richards, FM. The chemical shift index: a fast and multiple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1992;31:1647-51.
- [47] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on Melittin pores. *Biophys J* 2001;8:1475-85
- [48] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Ther* 2003;55:27-55.

Table 1: Molar ellipticity ($[\Theta]_{222}$, deg cm²/dmol) at 222 nm and corresponding α -helix fraction (f_H) for both peptides at 20 μ M in different environments.

	Anoplin-NH ₂		Anoplin-OH	
	$[\Theta]_{222}$ (degcm ² /dmol)	f_H	$[\Theta]_{222}$ (degcm ² /dmol)	f_H
Tris buffer	-1137.92	rc	-1138.40	rc
SDS 8 mM/buffer	-8649.60	0.302	-7762.81	0.315
PC	-1195.88	rc	-697.782	rc
PCPG 7030	-8124.95	0.282	-7231.21	0.293

rc = random coil

Table 2: Structure statistics for the ensemble of 20 Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH structures.

PROCHECK – NMR	Anoplin-NH ₂	Anoplin-OH
Most favored region (%)	100	100
Additionally allowed region (%)	0	0
Generously allowed region (%)	0	0
Disallowed region (%)	0	0
RMSD ^a		
Backbone (all)	0.14 \pm 0.06	0.18 \pm 0.08
Backbone (residues 3-10)	0.04 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
Heavy atoms (all)	0.45 \pm 0.19	0.82 \pm 0.11
Heavy atoms (residues 3-10)	0.45 \pm 0.16	0.52 \pm 0.17

^a Root mean square deviation from pairwise comparison between all the structures (\AA).

Table 3: Structural characteristics of ANPs, as obtained from NMR and MD data. The average twist angle has been calculated with HELANAL [3] and used in the hydrophobic moment calculation, according to Eisenberg consensus scale [17].

	Anoplin-NH ₂		Anoplin-OH	
	SDS (NMR)	TFE (MD)	SDS (NMR)	TFE (MD)
helix residues	3 - 10	2 - 10	2 - 10	2 - 7
average twist angle	105° \pm 9°	97° \pm 2°	103° \pm 5°	91° \pm 12°
hydrophobic moment	0.458	0.406	0.427	0.447
polar angle	70°	160°	110°	170°

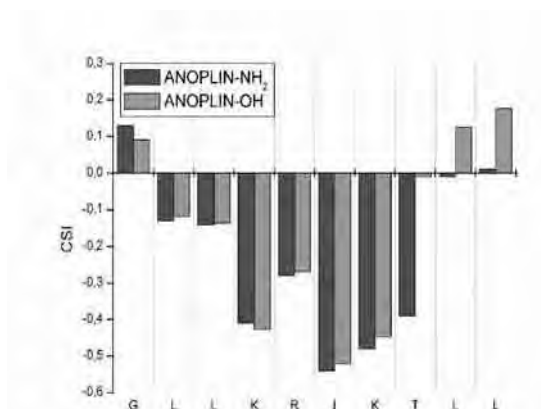


Figure 1: Chemical shift deviations for the α CH protons of Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH (0.8 mM) in 200 mM SDS at 30°C. The chemical shift differences were calculated by subtracting the observed value of the peptide from the random coil shifts given in the literature (Wishart, 1992).

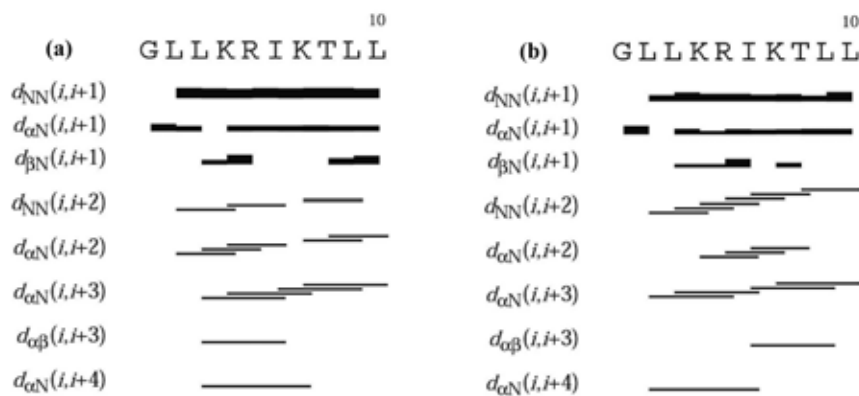


Figure 2: Summary of the sequential and medium-range NOE connectivities for (a) Anoplin-NH₂ (b) Anoplin-OH. The intensities of the observed NOEs are represented by the thickness of lines and were classified as strong, medium and weak, corresponding to upper bound constraints of 2.5, 3.5 and 5 Å, respectively.

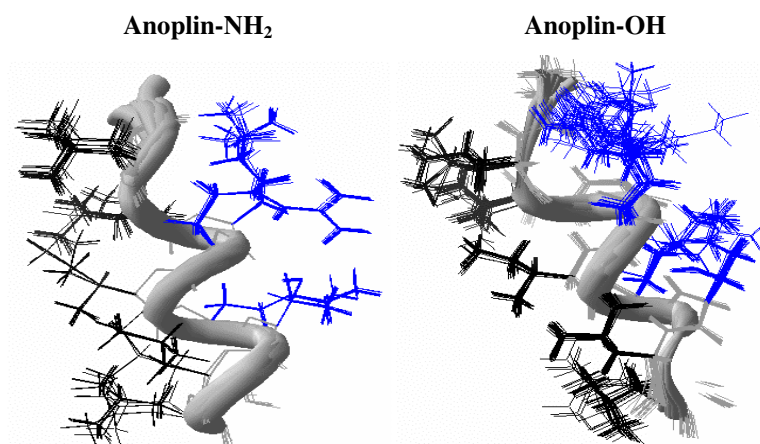


Figure 3: Superposition of final 20 calculated structures of the Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH, based on the minimum pairwise RMSD (0.45 ± 0.16 Å, and 0.52 ± 0.17 Å, respectively) of the peptide heavy atoms spanning residues 3 to 10, displaying the hydrophobic amino acids in black and the charged in blue, in the right. The C-terminus is shown at the bottom.

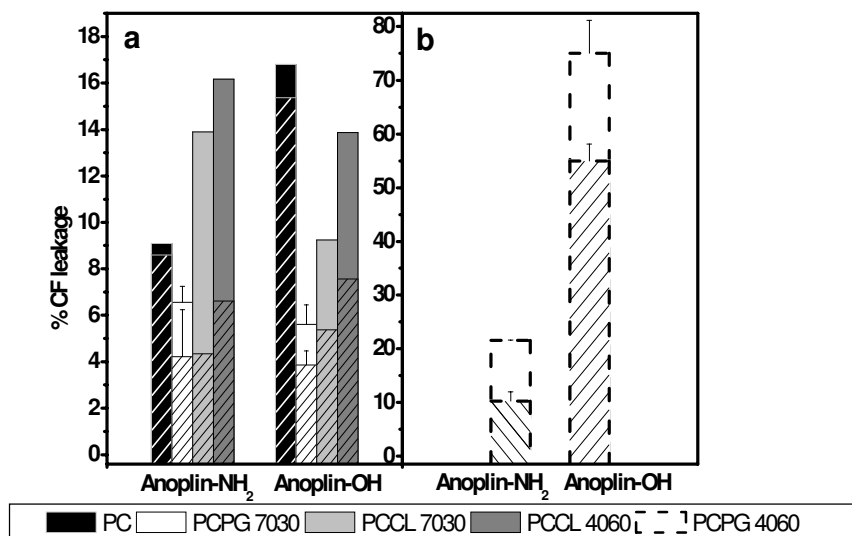


Figure 4(a): % CF leakage caused by Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH on zwitterionic PC vesicles at 10 μM concentration, and on anionic vesicles at 20 μM. Lip/Pep ratio varied from 50 to 5. (b) % CF leakage on PCPG 4060 at 20 μM peptide and 120 μM lipid concentration. Contact time 5 minutes shown in hatched bars and 20 minutes contact time (no pattern). Error bars are shown for both peptides with PCPG 7030 vesicles and PCPG 4060.

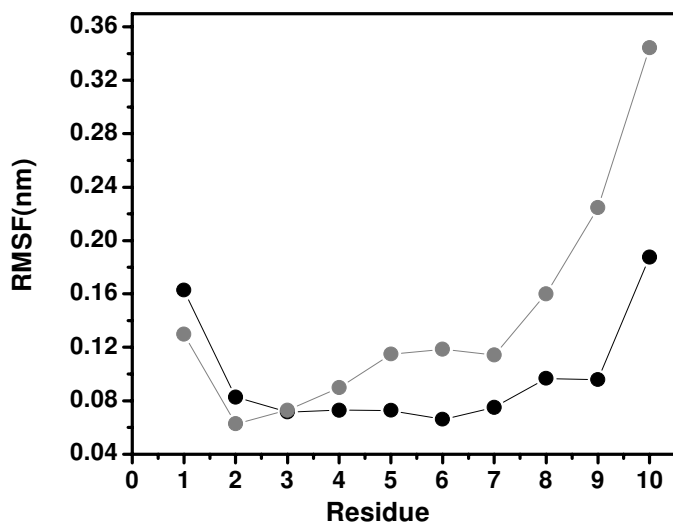


Figure 5: Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot, obtained from MD simulations, for Anoplin-NH₂ in black and Anoplin-OH in gray.

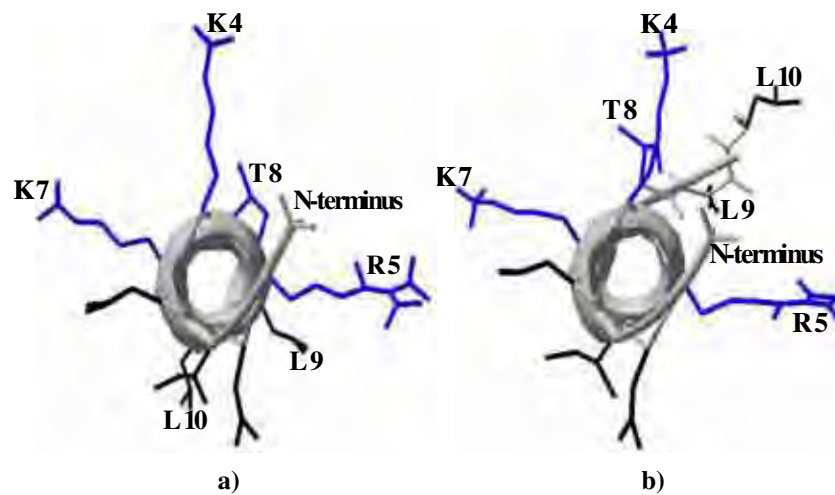


Figure 6: Anoplin-NH₂ (panel a) and Anoplin-OH (panel b) helical structures, projected on the normal plane to the helix axis, showing the polar angle between charged groups of Lys 7 and Arg 5. Side-chains of all hydrophobic residues, especially Leu 9 and Leu 10 are shown in black. Charged and polar residues are shown in blue. Structures as obtained from MD simulations in 30% TFE.

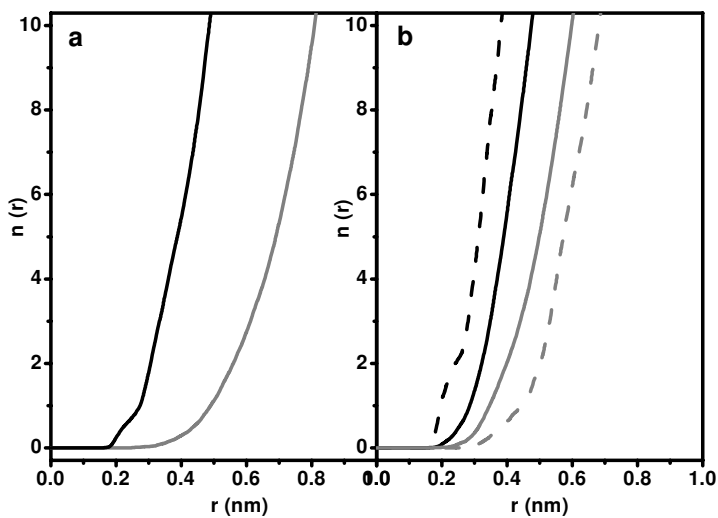


Figure 7: Running integration numbers (RIN), $n(r)$, of the pair radial distribution function (RDF) derived from MD simulations for Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH. Panel (a) shows RIN for the N-terminus of Anoplin-NH₂, with NH₃-F in gray and NH₃-W in black. Panel (b) shows RIN for the C-termini of both peptides: Anoplin-NH₂ (straight lines), NH₂-F in gray and NH₂-W in black, and Anoplin-OH (dash lines), O-F in gray and O-W in black.

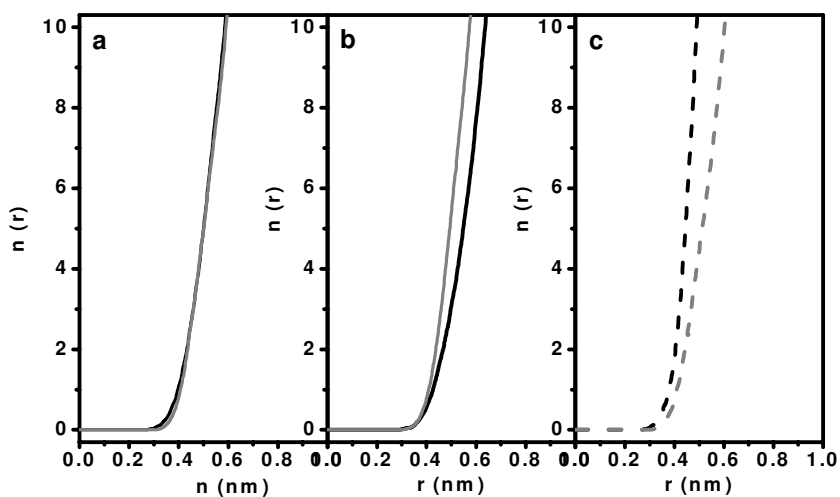


Figure 8, panel a: RIN for the side-chain of Leu 9 with F (in gray) and W (in black) for Anoplin-NH₂, which is equal to Anoplin-OH. Panel b: RIN for the side-chain of Leu 10 for Anoplin-NH₂ with F (in gray) and W (in black). Panel c: same as panel b for Anoplin-OH.