

ALAMETHICIN CSATORNÁK TÉRSZERKEZETI TULAJDONSÁGAI

Leitgeb Balázs

*MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet;
Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai Tanszék, Szeged*

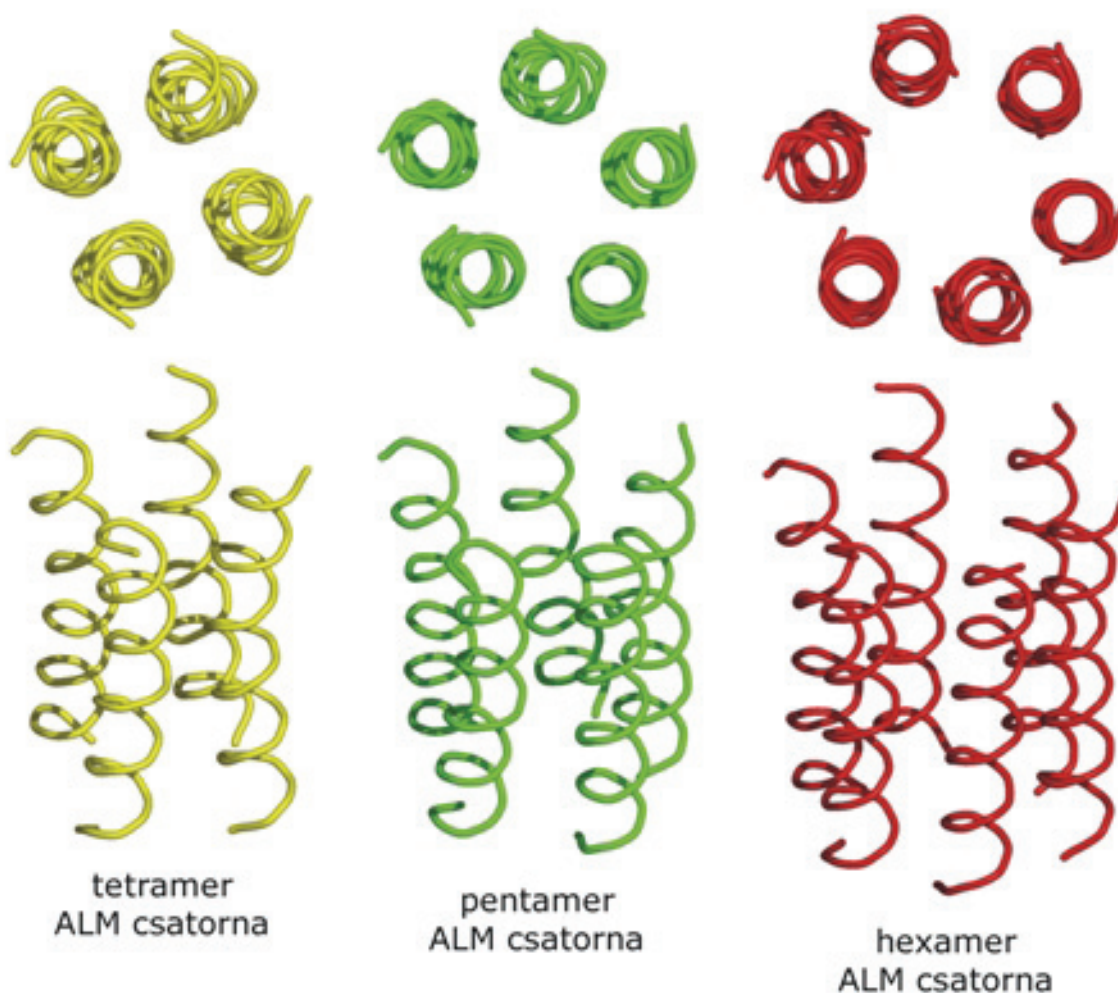
Bevezetés

Az alamethicin (ALM) a peptaibol peptidcsalád [1-4] egyik legintenzívebben tanulmányozott tagja [5, 6], amely antibakteriális és antifungális hatással rendelkezik, valamint hemolitikus aktivitással is jellemezhető [5, 6]. Az ALM molekulák és szintetikus analógjai esetén a térszerkezeti tulajdonságokat az eddigiek során különböző kísérleti és elméleti módszerekkel, illetve különféle körülmények között vizsgálták [4-7]. Az ALM képes kötődni a lipid kettősréteg felszínéhez és beágyazódni a membránba, ami egyrészt a hőmérséklettől, a peptid koncentrációtól és a peptid/lipid moláris aránytól, másrészt pedig a lipid kettősréteg típusától függ, figyelembe véve a membrán szerkezetét, elaszticitását és hidratáltsági szintjét. A beágyazódást követően az ALM képes oligomerizálódni és ezáltal csatornákat képezni a különböző mesterséges lipid kettősrétegekben, valamint a természetes sejtmembránokban. Habár az irodalomban az eddigiek során különböző csatorna modelleket javasoltak, az ALM esetén a „hordó-donga” modell számít a leginkább elfogadottnak [8, 9]. Ennek a modellnek megfelelően az ALM csatornákat a helikális monomerek parallel kötegei alakítják ki, amelyekben a monomerek egy központi vízzel töltött pórust vesznek körül. A „hordó-donga” vagy „hélix-köteg” modell esetében az α -helikális konformációval jellemezhető ALM monomerek úgy alakítják ki a csatornákat, hogy a hélixek N-terminális részei parallel módon egymás mellé rendeződnek, míg a pórus kiszélesedik a C-terminális részen a Pro¹⁴ aminosav által generált hajlított stuktúrájának köszönhetően [8]. Az amfipatikus ALM hélixek esetén a hidrofíl oldalak a központi pórus felé irányulnak, ugyanakkor a hidrofób oldalak pedig a lipidek felé fordulnak. Egy további jellegzetessége ennek a modellnek, hogy a szomszédos monomerek Gln⁷ aminosavainak oldalláncai között intermolekuláris H-kötések alakulhatnak ki, amelyek stabilizálják az ALM csatornák térszerkezetét.

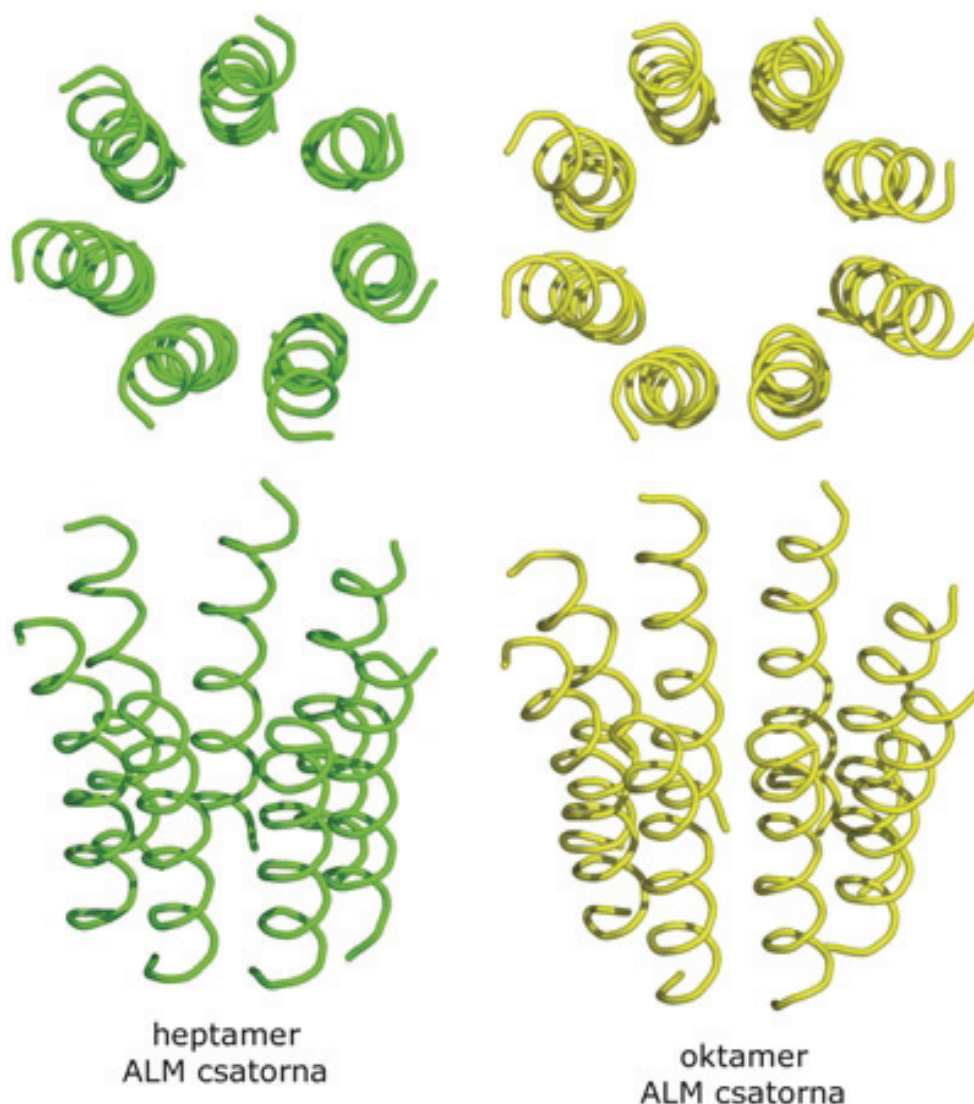
Alamethicin csatornák térszerkezete

Az ALM csatornák térszerkezet-vizsgálatát túlnyomórészt elméleti módszerek alkalmazásával végezték el, így ennek megfelelően az eredmények többsége

a különböző molekuladinamikai (MD) szimulációkból származik. Több MD számítást hajtottak végre különféle ALM csatornákra vonatkozóan, amelyek 4-8 helikális ALM monomert tartalmaztak (a tetramer ALM csatornától az oktamer ALM csatornáig) (1. és 2. ábra). A legtöbb esetben ezeket az ALM csatornákat egy palmitoil-oleoil-foszfatidilkolin (POPC) kettősrétegbe ágyazták be, és az MD szimulációkat vizes közegben végezték el, figyelembe véve a központi pórusban lévő, illetve a pórus nyílásainál található vízmolekulákat is. Ezen MD számítások során az ALM csatornák stabilitását és dinamikus tulajdonságait, illetve a másodlagos szerkezeti elemeket, valamint az intra- és intermolekuláris H-kötés mintázatokat tanulmányozták. Mindemellett az ALM monomerek különböző aminosavainak stabilizáló szerepét is vizsgálták, illetve a központi pórusban lévő víz szerkezeti és dinamikus sajátosságait is tanulmányozták.



1. ábra. Tetramer, pentamer és hexamer ALM csatornák.



2. ábra. Heptamer és oktamer ALM csatornák.

A különböző számú monomert tartalmazó ALM csatornák (a tetramer ALM csatornától az oktamer ALM csatornáig) esetén elvégzett MD szimulációk eredményei azt mutatták, hogy mindegyik csatorna egy torzult, balmenetes szupercoil szerkezetet vesz fel a központi pórus körül [10]. Emellett azt tapasztalták, hogy a helikális monomerekben előforduló szerkezeti torzulások ellenére az ALM peptidek konformációja hasonlónak bizonyult ahhoz, amit korábban a kristályszerkezetben megfigyeltek [8]. Az ezt követő MD számítások trajektóriáinak analízise alapján azt állapították meg, hogy a tetramer ALM nem alakított ki stabil csatornát, ugyanakkor a többi csatornával összehasonlítva a hexamer ALM csatorna sokkal stabilabbnak bizonyult [11]. Az összes ALM csatorna (a tetramer ALM csatornától az oktamer ALM csatornáig) esetében szerkezeti fluktuációt figyeltek meg a helikális monomerek Gly¹¹-Pro¹⁴ tetrapeptid

egységei közelében [11]. Mindemellett az ALM monomerek C-terminális részeit kevésbé helikálisnak találták, míg ezen ALM monomerek N-terminális részei kissé fluktuáltak [11, 12]. További MD szimulációk alapján hasonló flexibilitást figyeltek meg a helikális ALM monomerek fent említett tetrapeptid régiói és C-terminális szakaszai esetén [13]. A hexamer ALM csatorna esetében elvégzett részletes MD számítás alapján azt a következtetést vonták le, hogy az ALM monomerek főként α -helikális konformációban maradtak az MD szimuláció során [14]. Ennek ellenére az ALM monomerekre vonatkozóan az α -helikális szerkezettől való eltérést figyeltek meg, amelyet nagyobbak találtak a monomerek C-terminális részei esetén, mint az N-terminális szakaszok esetében.

Az ALM kristályszerkezete alapján azt javasolták, hogy a szomszédos hélixek Gln⁷ aminosavainak oldalláncai között kialakuló intermolekuláris H-kötések szerepet játszhatnak az ALM csatorna térszerkezetének stabilizálásában [8]. Az ALM csatornák (a tetramer ALM csatornától az oktamer ALM csatornáig) esetén elvégzett MD szimulációk alátámasztották ezt a korábbi feltételezést [10]. Az eredmények alapján azonban azt javasolták, hogy a hélixek közötti kölcsönhatások kialakításában vízmolekulák vehetnek részt, és így az ALM csatornák olyan H-kötésekkel stabilizálódnak, amelyek az ALM monomerek Gln⁷ aminosavainak oldalláncai és a pórusban található vízmolekulák között jönnek létre. A hexamer ALM csatorna esetében elvégzett további MD számítás alapján azt figyelték meg, hogy az ALM monomerek C-terminális részén lévő Glu¹⁸ és Gln¹⁹ aminosav, illetve a Pheol²⁰ amino-alkohol H-kötéseket alakíthat ki egyrészt a pórusban található vízmolekulákkal, másrészt pedig a lipid molekulákkal [14]. A H-kötések ez utóbbi típusát tekintve azt javasolták, hogy ezek a kölcsönhatások hozzájárulnak az ALM csatornák térszerkezetének stabilizálásához, illetve a hélixek lipid kettősréteghez való rögzítéséhez. Az ALM csatornák esetén a pórusban lévő vízmolekulák szerkezeti és dinamikus tulajdonságainak vizsgálata arra a megfigyelésre vezetett, hogy ezen vízmolekulákat illetően egy jól meghatározott vízoszlop található a csatornák központi pórusában [11, 12]. Emellett a pórusban lévő vízmolekulák dipólusmomentuma antiparallel módon igazodik az ALM hélixek dipólusmomentumaihoz képest [11, 13], és ezáltal hozzájárulnak az ALM csatornák stabilitásához.

Olyan MD szimulációkat is végeztek, amelyek során különböző ALM oligomereket illesztettek be két eltérő típusú pórusba (toroidális és cilindrikus pórus) annak érdekében, hogy tanulmányozzák az ALM oligomereknek a különféle alakú pórusokra vonatkozó preferenciáját [15]. Az eredmények arra a megfigyelésre

vezettek, hogy az MD számítások végére a hexamer ALM csatorna megtartotta a kiindulási cilindrikus alakú pórust, amennyiben a Gln⁷ aminosavak a póruson belül helyezkedtek el, azonban abban az esetben, amikor a Gln⁷ aminosavak nem orientálódtak a pórus belseje felé, akkor a pórus bezáródott. Ezek a megfigyelések egyezésben vannak azzal a leginkább elfogadott nézettel, miszerint az ALM a „hordó-donga” modellnek megfelelően alakít ki csatornákat. Az MD szimulációk alapján azt állapították meg, hogy a peptidek másodlagos szerkezete sokkal stabilabb egy cilindrikus pórusba beágyazott hexamer ALM csatorna esetén, mint egy toroidális pórusba beágyazott tetramer ALM csatorna esetében.

Az MD számítások mellett röntgenkristallográfiával is tanulmányozták az ALM csatorna szerkezetét, amely során az ALM peptidek által indukált transzmembrán csatorna elektronsűrűség profilját rekonstruálták [16]. Az ezen mérésből származó eredmények egyértelműen rámutattak arra, hogy az ALM molekulák által kialakított csatorna szerkezete megegyezik a nyolc ALM hélixből felépülő „hordó-donga” modellel. Ugyanakkor pásztázó alagútmikroszkópia alkalmazásával is vizsgálták a foszfolipid mátrixban az ALM peptidek által létrehozott csatorna szerkezetét [17]. Az eredmények azt mutatták, hogy az ALM csatornák nem random módon oszlanak el a monomolekuláris rétegben, hanem agglomerálódnak, és ezáltal egy hexagonális ráccsal jellemezhető kétdimenziós nanokristályt alakítanak ki. Mindemellett azt tapasztalták, hogy minden egyes ALM peptid két szomszédos csatorna kialakításában vesz részt, és mindegyik csatorna hat ALM molekulából épül fel. Azt is megfigyelték, hogy egy csatorna esetén csak három vagy négy ALM molekula Gln⁷ aminosava orientálódik a pórus közepe felé. Az eredmények egyrészt megerősítették azt a feltételezést, miszerint az amfipatikus ALM peptidek a „hordó-donga” modellnek megfelelően alakítanak ki csatornát a foszfolipid membránokban, másrészt pedig közvetlen bizonyítékot szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy az ALM csatornák klasztert képeznek.

Alamethicin analóg csatornák térszerkezete

Az ALM csatornákhöz hasonlóan több MD számítást végeztek el olyan csatornák esetében, amelyek az ALM szintetikus analógjaiból, illetve különböző dimerekből épültek fel.

Az ALM egyik analógja esetén az összes Aib aminosavat Leu-nal cserélték ki (ALM dUL), míg ezen peptid két további szerkezetileg módosított változata esetében a Gln⁷ aminosavat Asn-nal és Ser-nel helyettesítették (ALM dUL Q7N

és ALM dUL Q7S). Az ezen peptidekből felépülő hexamer ALM analóg csatornákra vonatkozóan végeztek el MD számításokat, és összehasonlították a csatornák térszerkezeti tulajdonságait [18]. Az eredmények alapján azt állapították meg, hogy ezek az ALM analóg csatornák hasonló konformációval jellemezhetők a helikális kötegeket illetően, azonban ezekben az esetekben nem figyelhető meg az a központi pórus körül kialakuló, balmenetes szupercoil szerkezet, amely jellemző az ALM csatornákra [10]. A három ALM analóg csatorna H-kötés mintázatának részletes összehasonlítása arra a megfigyelésre vezetett, hogy az ALM dUL és ALM dUL Q7N analóg csatornák esetén a Gln⁷ és Asn⁷ aminosavak által kialakított intermolekuláris H-kötések száma nagyobb, mint az ALM dUL Q7S analóg csatorna esetében a Ser⁷ aminosavak által kialakított H-kötések száma. Ezenkívül az utóbbi ALM analóg csatornát tekintve az intermolekuláris H-kötések nagy része ún. víz által közvetített H-kötésnek bizonyult. Ezek az eredmények rámutattak egyrészt a Gln⁷ aminosavak között létrejövő H-kötésekre, másrészt pedig a 7-es pozíciójú aminosavak és a vízmolekulák között kialakuló H-kötések jelentőségére, amely kölcsönhatások fontos szerepet játszhatnak az ALM csatornák térszerkezetének stabilizálásában.

Dimerekből álló ALM analóg csatornák térszerkezeti sajátosságait is vizsgálták, amely dimerek esetén az ALM monomerek C-terminális végeit kapcsolták össze pimelinsav-piperazin-diamiddal (PAPDA), illetve bis(N-3-aminopropil)-1,7-heptándiamiddal (BAPHDA) [19]. A hexamer ALM PAPDA és ALM BAPHDA analóg csatornák esetén elvégzett MD szimulációk eredményei azt mutatták, hogy a PAPDA és BAPHDA ugyan flexibilisnek bizonyult, azonban ezek nem okoztak jelentős torzulást a hexamer ALM analóg csatornák tekintetében. Mindemellett azt tapasztalták, hogy a dimerekben található ALM analóg monomerek α -helikális konformációja, illetve a hélixek összerendeződésének geometriája hasonló ahhoz, amit a hexamer ALM csatornák esetén megfigyeltek. További MD szimulációk során az ALM monomereket, illetve az ALM Q7N analóg monomereket, mely utóbbi peptid esetében a Gln⁷ aminosavat Asn-nal cserélték ki, kötötték össze BAPHDA-dal, és az ezen dimerekből álló hexamer ALM analóg csatornát vizsgálták [20]. Az eredmények alapján azt állapították meg, hogy az ALM BAPHDA analóg csatorna esetén megfigyelhető a szomszédos helikális monomerek Gln⁷ aminosavai által kialakított intermolekuláris H-kötés hálózat. Ugyanakkor az ALM Q7N BAPHDA analóg csatorna esetében arra a következtetésre jutottak, hogy az Asn⁷ aminosavak a központi pórusban található vízmolekulákkal alakíthatnak ki H-kötéseket. Egy dimerekből álló, oktamer ALM analóg csatornára vonatkozóan MD szimulációkat hajtottak végre, amely dimerekben két ALM Q18K analóg

monomert kötöttek össze, és ezen monomerek esetén a Gln¹⁸ aminosavat Lys-nel helyettesítették [21]. Az MD számítások alapján a Lys aminosavak ionizációs állapotának, illetve a só koncentrációnak az ALM analóg csatorna térszerkezetére kifejtett hatásait tanulmányozták. A töltött Lys aminosavakat tartalmazó ALM analóg csatornákat illetően azt a következtetést vonták le, hogy a só hiánya a csatorna jelentős deformációját okozta, míg 1 M KCl jelenlétében a csatorna térszerkezete változatlan maradt.

Egy ALM analóg esetén, amelyben a Gln⁷ aminosavat Lys-nel cserélték ki (ALM Q7K), MD szimulációkat végeztek el annak érdekében, hogy tanulmányozzák ezen ALM analógnak a csatornaképzését, illetve a töltött aminosavak pórusképzésre kifejtett hatásait [22]. Hasonló elméleti módszereket alkalmaztak mint korábban az ALM esetében [15], és ezeket a peptideket egy cilindrikus pórusba illesztették be. A korábbi eredmények azt mutatták, hogy a hexamer ALM csatorna jobban preferálta a cilindrikus pórust mint a toroidális pórust [15], azonban ezen MD számítás alapján azt állapították meg, hogy a hexamer ALM Q7K analóg csatorna egy szemitoroidális pórust alakít ki. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a peptidek N-terminális részén található töltött aminosavak fontos szerepet játszanak a toroidális pórus kialakulásában. Habár az ALM Q7K analóg által kialakított csatorna a peptidek transzmembrán orientációit illetően különbözött attól, amit korábban az ALM esetén megfigyeltek [15], az ALM Q7K analóg helikális tartalma hasonlóan bizonyult ahhoz, amit az ALM esetében kiszámítottak.

Összefoglalás

Az eddigiek során a különböző számú helikális monomert tartalmazó ALM és ALM analóg csatornák térszerkezetét főként MD szimulációk alapján tanulmányozták. Ezen csatornák esetén egyrészt a stabilitást és a dinamikus tulajdonságokat, másrészt pedig az előforduló másodlagos szerkezeteket, valamint a kialakuló intra- és intermolekuláris H-kötéseket vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy az ALM és ALM analóg csatornákat felépítő monomerek helikális (főként α -helikális) szerkezettel jellemezhetők. Emellett az eredmények arra is utaltak, hogy a helikális monomerek között, illetve a monomerek és a pórusban található vízmolekulák között, valamint a monomerek és a lipidek között létrejövő intermolekuláris H-kötések fontos szerepet játszhatnak az ALM és ALM analóg csatornák térszerkezetének stabilizálásában. Összességében az eddigi szerkezetvizsgálati munkák alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az ALM és analógjai a „hordó-donga” modellnek megfelelően alakítanak ki csatornákat a membránokban.

Köszönetnyilvánítás

A kézirat elkészítése a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kézirat elkészítése az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) K 106000 támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- [1] Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. (2005) Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* - A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **52**: 137-168.
- [2] Peptaibiotics, (2007) *Chem Biodivers*, **4**: 1021-1412.
- [3] Peptaibiotics II, (2013) *Chem Biodivers*, **10**: 731-961.
- [4] Leitgeb, B. (2014) Bioaktív peptaibol molekulák. *Biokémia*, **XXXVIII(2)**: 36-49.
- [5] Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2007) The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chem Biodivers*, **4**: 1027-1051.
- [6] Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vágvölgyi, C., Leitgeb, B. (2013) Recent results in alamethicin research. *Chem Biodivers*, **10**: 744-771.
- [7] Leitgeb, B. (2014) Alamethicin peptidek térszerkezeti tulajdonságai. *Biokémia*, **XXXVIII(4)**: 55-64.
- [8] Fox, R. O., Richards, F. M. (1982) A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature*, **300**: 325-330.
- [9] Mathew, M. K., Balaram, P. (1983) A helix dipole model for alamethicin and related transmembrane channels. *FEBS Lett*, **157**: 1-5.
- [10] Breed, J., Biggin, P. C., Kerr, I. D., Smart, O. S., Sansom, M. S. P. (1997) Alamethicin channels - modelling via restrained molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta*, **1325**: 235-249.
- [11] Tieleman, D. P., Hess, B., Sansom, M. S. P. (2002) Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin. *Biophys J*, **83**: 2393-2407.
- [12] Tieleman, D. P., Breed, J., Berendsen, H. J. C., Sansom, M. S. P. (1998) Alamethicin channels in a membrane: molecular dynamics simulations. *Faraday Discuss*, **111**: 209-223.

- [13] Breed, J., Sankararamakrishnan, R., Kerr, I. D., Sansom, M. S. P. (1996) Molecular dynamics simulations of water within models of ion channels. *Biophys J*, **70**: 1643-1661.
- [14] Tieleman, D. P., Berendsen, H. J. C., Sansom, M. S. P. (1999) An alamethicin channel in a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **76**: 1757-1769.
- [15] Mihajlovic, M., Lazaridis, T. (2010) Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochim Biophys Acta*, **1798**: 1485-1493.
- [16] Qian, S., Wang, W., Yang, L., Huang, H. W. (2008) Structure of the alamethicin pore reconstructed by X-ray diffraction analysis. *Biophys J*, **94**: 3512-3522.
- [17] Pieta, P., Mirza, J., Lipkowski, J. (2012) Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 21223-21227.
- [18] Breed, J., Kerr, I. D., Molle, G., Duclouhier, H., Sansom, M. S. P. (1997) Ion channel stability and hydrogen bonding: molecular modelling of channels formed by synthetic alamethicin analogues. *Biochim Biophys Acta*, **1330**: 103-109.
- [19] You, S., Peng, S., Lien, L., Breed, J., Sansom, M. S. P., Woolley, G. A. (1996) Engineering stabilized ion channels: covalent dimers of alamethicin. *Biochemistry*, **35**: 6225-6232.
- [20] Jaikaran, D. C. J., Biggin, P. C., Wenschuh, H., Sansom, M. S. P., Woolley, G. A. (1997) Structure-function relationships in helix-bundle channels probed via total chemical synthesis of alamethicin dimers: effects of a Gln⁷ to Asn⁷ mutation. *Biochemistry*, **36**: 13873-13881.
- [21] Tieleman, D. P., Borisenko, V., Sansom, M. S. P., Woolley, G. A. (2003) Understanding pH-dependent selectivity of alamethicin K18 channels by computer simulation. *Biophys J*, **84**: 1464-1469.
- [22] Mihajlovic, M., Lazaridis, T. (2012) Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, **1818**: 1274-1283.



Leitgeb Balázs 2000-ben kémia tanári és 2002-ben biológia tanári diplomát szerzett a Szegedi Tudományegyetemen, majd ezt követően 2006-ban szerezte meg Ph.D. fokozatát. 2004 óta az MTA SZBK Biofizikai Intézetében végzi kutatómunkáját, és 2009-2012 között egy hároméves OTKA posztdoktori kutatási pályázat témavezetője volt. 2010-ben megkapta az Akadémiai Ifjúsági Díjat, illetve 2010-től kezdődően három évre elnyerte a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjat. Ezt követően 2013-ban 16 hónapra elnyerte a Magyar Zoltán Posztdoktori Ösztöndíjat, amelynek keretében az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén is folytatja kutatói és oktatói tevékenységét. Fő kutatási területe bioaktív peptidok térszerkezetének, folding folyamatainak, szerkezet-aktivitás összefüggéseinek és hatásmechanizmusának tanulmányozása molekulamodellézési módszerek alkalmazásával.