

BIOAKTÍV PEPTAIBOL MOLEKULÁK

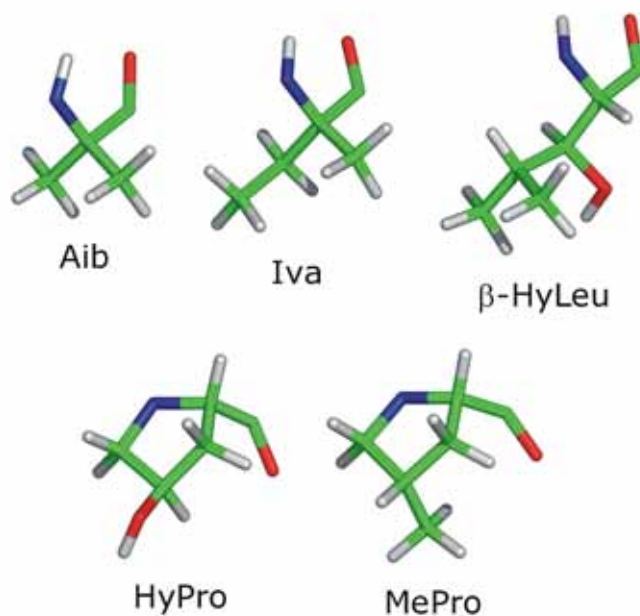
Leitgeb Balázs

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

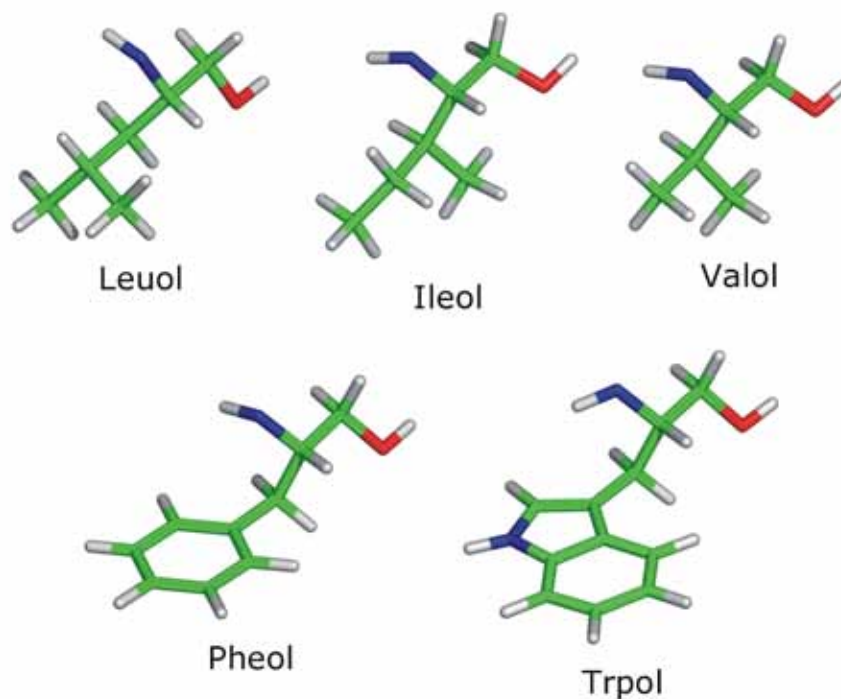
Általános jellemzés

A peptaibol molekulák gombák által termelt peptid antibiotikumok, amelyek az antimikrobiális peptidek népes családjába tartoznak [1-3]. A peptaibol peptidcsalád első tagját, az alamethicint 1967-ben izolálták a *Trichoderma viride* gombából [4, 5], és az azóta eltelt közel ötven év alatt már több mint 1000 peptaibol molekulát azonosítottak [6]. Nemcsak a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajok termelnek peptaibolokat, hanem más nemzetségek (pl. *Acremonium*, *Emericellopsis*, *Hypocrea*, *Mycogone*, *Paecilomyces*, *Sepedonium* és *Stilbella*) gombafajaiból is izoláltak peptaibol molekulákat [1]. Mivel egyre újabb és újabb peptaibolokat azonosítanak, így a peptaibol család tagjainak száma folyamatos növekedést mutat.

A peptaibol elnevezés a peptidcsaládot alkotó molekulák három jellegzetes tulajdonsága alapján származtatható, miszerint a peptaibolok peptidek, illetve nagy számban tartalmazzák α -aminoizovajsavat (Aib), valamint a molekulák C-terminális végén általában egy amino-alkohol egység található [1]. A peptaibol elnevezés tehát a fent említett három karakterisztikus sajátosság alapján áll össze, azaz: **peptaibol** = **peptide** + **Aib** + amino alcohol. A peptaibol molekulák 5-20 aminosavból épülnek fel, és több nem-proteinogén aminosavat is tartalmazzák (pl. Aib; izovalin, Iva; β -hidroxileucin, β -HyLeu; hidroxiprolin, HyPro és metilprolin, MePro) (1. ábra) [1]. A peptaibolok többsége esetén az N-terminális aminosav acetilált, míg a peptidek C-terminális végéhez egy amino-alkohol egység kapcsolódik (pl. leucinol, Leuol; izoleucinol, Ileol; valinol, Valol; fenilalaninol, Pheol és triptofanol, Trpol) (2. ábra) [1].



1. ábra. A peptaibol molekulákban előforduló nem-proteinogén aminosavak: α -aminoizovajsav, Aib; izovalin, Iva; β -hidroxileucin, β -HyLeu; hidroxiprolin, HyPro és metilprolin, MePro.



2. ábra. A peptaibol molekulákban található amino-alkohol egységek: leucinol, Leuol; izoleucinol, Ileol; valinol, Valol; fenilalaninol, Pheol és triptofanol, Trpol.

Bioszintézis és biológiai hatások

A peptaibol molekulák nem-riboszómális bioszintézis úton jönnek létre, melynek során nagy multifunkcionális enzimek (ún. peptid szintetázok) játszanak szerepet

a bioszintézisben [1]. Ezek a peptid szintetázok egy tiotemplát mechanizmus által építik fel a peptaibolokat a különböző prekursorokból. A peptid szintetázok moduláris szerkezettel jellemezhetők, ahol mindegyik modul szemiautonóm egységként funkcionál, és ezek a modulok ismerik fel, aktiválják és módosítják a szintetizálódott peptidek különféle aminosav egységeit.

A nem-riboszómális bioszintézis úton létrejött peptaibolok általában mikroheterogén elegyként szintetizálódnak [1]. Ez azt jelenti, hogy egyrészt eltérő szekvencia hosszal rendelkező peptidek találhatók egy adott csoporton belül, másrészt pedig többfajta, különböző aminosav összetételű, de azonos szekvencia hosszal rendelkező peptid szintetizálódik egyszerre. Ilyen mikroheterogén elegyként szintetizálódnak például az alamethicinek (ALM): ALM F30 és ALM F50 molekulák [4, 7], amelyek 20 aminosavból épülnek fel; illetve a harzianinok (H): a 11 aminosavból álló H B-I és H K-VI peptid [8, 9], a 14 aminosavból felépülő H C molekulák [10] és a 18 aminosavból álló H A-V peptid [11]; valamint a hypomurocinok (HM): a 11 aminosavból felépülő HM A molekulák [12] és a 18 aminosavból álló HM B peptidek [12] (1. táblázat).

A peptaibol molekulák a biológiai hatások széles spektrumával jellemezhetők [1], úgymint antibakteriális hatás (pl. *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* és *Streptococcus* fajokkal szemben); antifungális hatás (pl. *Aspergillus*, *Candida*, *Dictyostelium*, *Mucor* és *Penicillium* fajokkal szemben); antivirális hatás; hemolitikus aktivitás; immunszuppresszív sajátság; neuroleptikus sajátság; membrán-kötött enzimek aktiválása; és képesek pórusokat kialakítani a membránokban.

Csoportosítás és adatbázisok

A peptaibol molekulákat az eddigiek során már többféleképpen csoportosították [1]. Egy korábbi felosztás szerint a peptaibolokat kilenc különböző alcsaládba (SF1-SF9) sorolták be egyrészt az aminosav tartalmuk, másrészt pedig a szekvencia hosszuk alapján. Az ezen felosztás szerint kapott mindegyik alcsaládba karakterisztikus szekvencia hosszal rendelkező peptidek tartoznak, amelyek bizonyos aminosavakat tartalmaznak adott pozíciókban a szekvenciájukat illetően. Két másik, egyszerűbb felosztás alapján a peptaibol molekulákat a szekvencia hosszuk, vagyis a peptideket felépítő aminosavak száma alapján az alábbi módokon csoportosíthatjuk.

1. táblázat: Mikroheterogén elegyként szintetizálódó peptaibol molekulák szekvenciái. Alamethicinek, harzianinok és hypomurocinok.

Alamethicinek

Alamethicin F30/1, F30/2, F30/3, F30/4, F30/5, F30/6, F30/7, F30/8, F30/9, F30/10;

Ac-Aib¹-Pro²-Aib³-Ala⁴-Aib⁵-Xaa⁶-Xaa⁷-Aib⁸-Xaa⁹-Aib¹⁰-
Xaa¹¹-Xaa¹²-Aib¹³-Pro¹⁴-Val¹⁵-Aib¹⁶-Xaa¹⁷-Glu¹⁸-Gln¹⁹-Pheol²⁰;

ahol Xaa⁶: Ala/Aib, Xaa⁷: Glu/Gln, Xaa⁹: Aib/Leu/Val, Xaa¹¹: Ala/Gly,
Xaa¹²: Leu/Val, Xaa¹⁷: Aib/Val;

Alamethicin F50/2, F50/3a, F50/3b, F50/3c, F50/4a, F50/4b, F50/5, F50/6a, F50/6b, F50/7, F50/8a, F50/8b, F50/8c;

Ac-Aib¹-Pro²-Xaa³-Xaa⁴-Xaa⁵-Xaa⁶-Gln⁷-Aib⁸-Xaa⁹-Aib¹⁰-
Gly¹¹-Xaa¹²-Aib¹³-Pro¹⁴-Xaa¹⁵-Aib¹⁶-Xaa¹⁷-Gln¹⁸-Gln¹⁹-Pheol²⁰;

ahol Xaa³: Ala/Aib, Xaa⁴: Ala/Aib, Xaa⁵: Ala/Aib, Xaa⁶: Ala/Aib/Gly,
Xaa⁹: Ala/Aib/Leu/Val/Iva, Xaa¹²: Leu/Val, Xaa¹⁵: Val/Iva,
Xaa¹⁷: Aib/Val/Iva;

Harzianinok

Harzianin B-I, K-VI;

Ac-Aib¹-Asn²-Xaa³-Ile⁴-Aib⁵-Pro⁶-Xaa⁷-Leu⁸-Aib⁹-Pro¹⁰-Leuol¹¹;

ahol Xaa³: Leu/Ile, Xaa⁷: D-Iva/Leu;

Harzianin C-I, C-III, C-VI, C-VIII, C-IX, C-X, C-XI, C-XII, C-XIII, C-XIV, C-XV;

Ac-Aib¹-Xaa²-Leu³-Aib⁴-Pro⁵-Xaa⁶-Xaa⁷-Aib⁸-Pro⁹-Xaa¹⁰-
Leu¹¹-Aib¹²-Pro¹³-Leuol¹⁴;

ahol Xaa²: Asn/Gln, Xaa⁶: Ala/Ser, Xaa⁷: Ile/Val, Xaa¹⁰: Aib/D-Iva;

Harzianin A-V;

Ac-Aib¹-Gly²-Ala³-Aib⁴-D-Iva⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Gly¹⁰-
Leu¹¹-Aib¹²-Pro¹³-Leu¹⁴-Aib¹⁵-D-Iva¹⁶-Gln¹⁷-Leuol¹⁸;

Hypomurocinok

Hypomurocin A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-5a;

Ac-Xaa¹-Gln²-Xaa³-Xaa⁴-Aib⁵-Pro⁶-Leu⁷-Xaa⁸-Aib⁹-Pro¹⁰-Leuol¹¹;

ahol Xaa¹: Aib/D-Iva, Xaa³: Ile/Val, Xaa⁴: Leu/Ile/Val, Xaa⁸: Leu/Ile;

Hypomurocin B-1, B-2, B-3a, B-3b, B-4, B-5;

Ac-Aib¹-Xaa²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Xaa⁷-Val⁸-Aib⁹-Gly¹⁰-
Xaa¹¹-Aib¹²-Pro¹³-Leu¹⁴-Aib¹⁵-Aib¹⁶-Gln¹⁷-Xaaol¹⁸;

ahol Xaa²: Ala/Ser, Xaa⁷: Aib/D-Iva, Xaa¹¹: Aib/D-Iva,
Xaaol¹⁸: Leuol/Valol;

Az egyik esetben három csoportot különböztethetünk meg: (1) rövid szekvenciájú peptaibolok, amelyek 5-10 aminosavból épülnek fel; (2) közepes szekvenciájú peptaibolok, amelyek 11-16 aminosavból állnak; (3) hosszú szekvenciájú peptaibolok, amelyek 17-20 aminosavból épülnek fel. A másik esetben a peptaibol molekulákat két csoportba sorolhatjuk be: (1) rövid szekvenciával rendelkező peptaibolok, amelyek 10-16 aminosavból állnak (pl. H B, H K, HM A és H C peptidek) (1. táblázat); (2) hosszú szekvenciával rendelkező peptaibolok, amelyek 17-20 aminosavból épülnek fel (pl. H A, HM B és ALM peptidek) (1. táblázat).

A különböző gombafajokból izolált és azonosított peptaibol molekulákat összegyűjtötték, és eddig két adatbázis készült a peptaibolokra vonatkozóan. Egy korábbi, 2004-ben készített adatbázis (The Peptaibol Database; <http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk>) több mint 300 peptaibol molekulát tartalmaz, amelyekkel kapcsolatban az alábbi adatok találhatók meg az adatbázisban: a peptaibolok szekvenciái, a peptaibolokat termelő organizmusok, szakirodalmi adatok és hivatkozások, néhány peptaibol molekula esetén térszerkezeti információk [13]. Egy későbbi, 2013-ban készült adatbázisban (The Comprehensive Peptaibiotics Database; <http://peptaibiotics-database.boku.ac.at>) már több mint 1000 peptaibol molekula található meg, és ebben az adatbázisban a következő adatok lelhetők fel: a peptaibolok szekvenciái, a peptaibolok különböző csoportjai, a peptaibolokat termelő organizmusok, szakirodalmi adatok és hivatkozások [6].

Térszerkezeti tulajdonságok

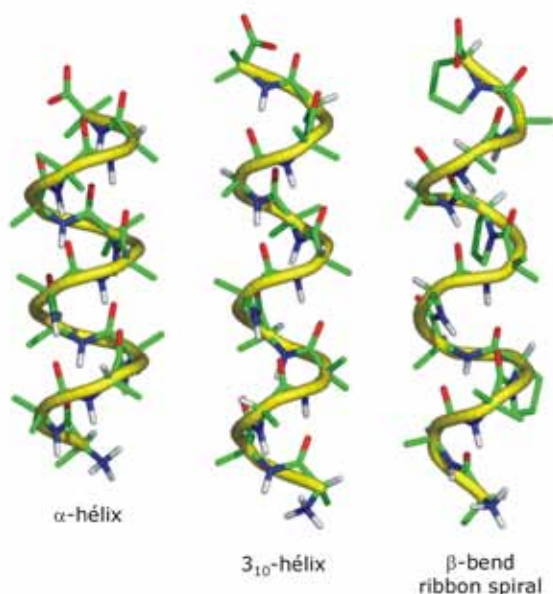
Ezidáig már több peptaibol molekula térszerkezeti tulajdonságait határozták meg főként kísérleti módszerekkel, azonban számos peptaibol esetén csak az elsődleges szerkezet, vagyis az aminosav szekvencia ismert, és ezen peptidek térszerkezetére vonatkozóan nem található semmiféle adat az irodalomban. Az eddigi szerkezetvizsgálati munkák során egyrészt különböző kísérleti módszereket (röntgenkristallográfia, cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia, Raman spektroszkópia, Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia és mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia) használtak, másrészt pedig különféle elméleti módszereket („távolság-geometria” (DG), szimulált anelláció (SA) és molekuladinamika (MD)) alkalmaztak [1]. Mindemellett a peptaibolok térszerkezeti sajátosságainak azonosítására felhasználták a kísérleti és elméleti módszerek kombinációit is. A peptaibol molekulák térszerkezetét eltérő körülmények között, illetve különböző környezetben tanulmányozták, úgymint kristályszerkezetben, vizes oldatban, különféle szerves oldószerekben, micellák

jelenlétében, membránhoz kötöten, valamint membránba ágyazódva [1].

Az eddigi eredmények alapján megállapítható, hogy a peptaibolok általában valamilyen helikális szerkezettel (α -hélix, 3_{10} -hélix és β -bend ribbon spiral) (3. ábra) jellemezhetők [1]. Ezek a helikális struktúrák megjelenhetnek a peptid teljes szekvenciája mentén, vagy a peptid szekvenciáját tekintve annak csak egy bizonyos részében. Mindemellett előfordulhat egyrészt olyan eset, amikor a peptid csak egyfajta helikális szerkezetet (α -hélix vagy 3_{10} -hélix) tartalmaznak, másrészt pedig olyan eset is, amikor a peptidben kétfajta helikális struktúra (kevert $\alpha/3_{10}$ -helikális motívum) is megjelenik egyszerre. A fent említett helikális szerkezetek az alábbi karakterisztikus Φ és Ψ torziós szög értékekkel rendelkeznek, amelyek alapján meghatározhatók: (1) α -hélix: $\Phi = -60^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi = -50^\circ \pm 30^\circ$ [1]; (2) 3_{10} -hélix: $\Phi = -60^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi = -30^\circ \pm 30^\circ$ [1]; (3) β -bend ribbon spiral az (Xaa-Yaa-Aib-Pro) szekvencia motívumokra vonatkozóan: $\Phi_i = -90^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi_i = -27^\circ \pm 30^\circ$, $\Phi_{i+1} = -98^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi_{i+1} = -17^\circ \pm 30^\circ$, $\Phi_{i+2} = -49^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi_{i+2} = -50^\circ \pm 30^\circ$, $\Phi_{i+3} = -78^\circ \pm 30^\circ$ és $\Psi_{i+3} = 3^\circ \pm 30^\circ$ [14]. Ezeket a helikális struktúrákat a következő jellegzetes intramolekuláris H-kötések stabilizálják [1]: (1) az α -hélix esetén: $i \leftarrow i+4$ vagy $1 \leftarrow 5$ H-kötés, amely az $i+4$ pozíciójú aminosav NH donor csoportja és az i pozíciójú aminosav CO akceptor csoportja között létrejövő H-kötés; (2) a 3_{10} -hélix esetében: $i \leftarrow i+3$ vagy $1 \leftarrow 4$ H-kötés, amely az $i+3$ pozíciójú aminosav NH donor csoportja és az i pozíciójú aminosav CO akceptor csoportja között kialakuló H-kötés; (3) a β -bend ribbon spiral esetén: $i \leftarrow i+3$ vagy $1 \leftarrow 4$ H-kötés.

Mint az korábban említésre került, több peptaibol térszerkezetét tanulmányozták

már ezidáig, azonban a továbbiakban a peptaibolok bioszintézisének példaként említett molekulák (alamethicin, harzianin és hypomurocin peptid) (1. táblázat) térszerkezetére vonatkozó eredmények kerülnek bemutatásra.



3. ábra. A peptaibol molekulák jellegzetes helikális szerkezetei: α -hélix, 3_{10} -hélix és β -bend ribbon spiral.

Alamethicinek

Az ALM esetén számos szerkezetvizsgálatot végeztek el különböző kísérleti és elméleti módszerek alkalmazásával különféle körülmények között annak érdekében, hogy azonosítsák ennek a peptidnek a térszerkezeti tulajdonságait.

Az ALM kristályszerkezete alapján azt állapították meg, hogy ez a peptid nagyrészt α -helikális konformációval rendelkezik, azonban egy kisebb torzulás figyelhető meg a helikális szerkezetre vonatkozóan a Pro¹⁴ aminosav környékén [15]. Az eredmények azt mutatták, hogy az ALM szerkezetileg két helikális résszel jellemezhető, amelyeket a Pro¹⁴ aminosav körüli hajlított struktúra köt össze, és a két hélix tengelye 20°-os szöget zár be egymással. A kialakuló intramolekuláris H-kötés mintázat egyezést mutatott a megjelenő másodlagos szerkezeti elemekkel [15]. Ennek alapján az ALM molekula N- és C-terminális részeiben az α -helikális konformációra jellemző H-kötés mintázat figyelhető meg, míg a Pro¹⁴ körüli hajlított szerkezet esetén 1 $\leftarrow$ 4 H-kötés található.

Több NMR mérést is végeztek az ALM esetén, és ezek közül néhány mérés eredménye azt mutatta, hogy ez a peptid szerkezetileg két régióra osztható [16-19]. A kristályszerkezettel egyezésben majdnem az összes NMR vizsgálat arra az eredményre vezetett, hogy az ALM molekula N-terminális részében túlnyomórészt α -helikális konformáció jelenik meg. Ugyanakkor az ALM peptid C-terminális részére vonatkozóan különböző másodlagos szerkezeti elemeket javasoltak. Az egyik NMR mérés alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a C-terminális rész egy nyújtott β -szál konformációt vesz fel vizes oldatban és metanolban [16]. Ezzel ellentétben, egy másik, metanolban végrehajtott NMR mérés arra a megfigyelésre vezetett, hogy a C-terminális rész a kristályszerkezethez hasonló α -helikális konformációval jellemezhető, azonban a C-terminális dipeptid szakasz valamivel nyújtottabb szerkezetet mutat [17]. Egy további, metanolban elvégzett NMR mérés eredményei pedig azt mutatták, hogy a C-terminális rész kevésbé határozott szerkezettel rendelkezik [18]. Emellett egy következő, metanolban és micella jelenlétében elvégzett NMR mérés, illetve az azt követő DG és SA számítások alapján azt a következtetést vonták le, hogy a C-terminális rész kevésbé rendezett és flexibilis szerkezettel jellemezhető, ugyanakkor az SA számításokkal kapott struktúrák esetén a C-terminális rész tartalmazott helikális szakaszokat [19].

Más NMR mérések azt mutatták, hogy az ALM túlnyomórészt α -helikális konformációt vesz fel szerves oldószerekben és micellák jelenlétében, amely

alapvetően megegyezik a korábban meghatározott kristályszerkezettel [20-22]. Egy következő vizsgálat alapján, amely során az NMR mérést kombinálták a DG/SA módszerrel, azt állapították meg, hogy az ALM szerkezetileg az alábbi részekre osztható [23]: (1) helikális konformáció (1-10 aminosavak); (2) hajlított szerkezet a Pro¹⁴ aminosav körül; (3) helikális konformáció (13-18 aminosavak). Mindemellett azt tapasztalták, hogy a 18-as és 19-es pozícióban lévő aminosavakból álló dipeptid egység rendelkezik a legkevésbé határozott szerkezettel. További NMR mérések során az ALM molekulában kialakuló intramolekuláris H-kötések stabilitását tanulmányozták metanolban, illetve membrán jelenlétében [24, 25]. Ezekben az esetekben is helikális szerkezetet figyeltek meg, és az eredmények azt mutatták, hogy a Pro¹⁴ aminosav nem változtatja meg jelentősen a H-kötés mintázatot, amely hasonlónak bizonyult ahhoz a H-kötés mintázathoz, amit korábban a kristályszerkezetben is megfigyeltek.

A CD, Raman és FTIR mérések hasonló eredményekre vezettek mint amiket a röntgenkristallográfiás és NMR mérések alapján meghatároztak, melyek szerint az ALM főként helikális szerkezettel jellemezhető szerves oldószerekben és membránok jelenlétében [26-28].

NMR mérésből származó kényszerfeltételekkel, illetve kényszerfeltételek nélkül elvégzett MD számítások alapján, figyelembe véve a szerkezeti tulajdonságokat, a dinamikus viselkedést és a flexibilitást, az ALM teljes szekvenciáját illetően három régiót lehetett megkülönböztetni [29]. Az „A” régió az N-terminális 1-9 aminosavakat foglalja magában, amely α -helikális konformációval rendelkezik. A „C” régió a C-terminális 12-20 aminosavakat öleli fel, és ez a flexibilis régió határozatlan szerkezettel jellemezhető, azonban bizonyos mértékben megfigyelhetők 3_{10} -helikális szakaszok ebben a régióban. A „B” régió a 10-es és 11-es pozícióban található aminosavakat foglalja magában, amely összeköti az „A” és „C” régiókat, és ez a dipeptid egység mutatta a legnagyobb flexibilitást. További SA számítások és kényszerfeltételekkel végrehajtott MD szimulációk eredményei azt mutatták, hogy az ALM molekulában található két helikális szakasz által bezárt szög kb. 20° [30], hasonlóan ahhoz, amit a kristályszerkezet esetén is megfigyeltek. Mindemellett ezt a helikális konformációt javasolták az ALM stabil szerkezetének. Kloroformban elvégzett MD számítások során azt tapasztalták, hogy az ALM megtartotta a túlnyomórészt α -helikális konformációját, azonban különböző szerkezeti sajátosságokat figyeltek meg a Gly¹¹-Pro¹⁴ tetrapeptid egység, valamint a Pheol²⁰ körüli C-terminális régió esetében [22].

További, metanolban végrehajtott MD szimulációk során egyrészt egy ideális α -helikális konformációból, másrészt pedig az ALM kristályszerkezetéből kiindulva a másodlagos szerkezeti elemeket és H-kötés mintázatokat tanulmányozták, illetve ezek dinamikus tulajdonságait és stabilitását vizsgálták. Az egyik esetben azt tapasztalták, hogy mindkét kiindulási konformáció esetén egy jól meghatározott struktúra alakult ki az MD számítások során, amely túlnyomórészt α -helikális szerkezettel jellemezhető, azonban az Aib¹⁰-Aib¹³ tetrapeptid egységre vonatkozóan szerkezeti változatosságot figyeltek meg [31]. Ezeknek a konformációs tulajdonságoknak megfelelően egy karakterisztikus H-kötés mintázatot azonosítottak, amelyben az α - és 3_{10} -hélixekre jellemző H-kötések keverten jelentek meg. Az Aib¹⁰-Aib¹³ tetrapeptid egység esetében megfigyelt szerkezeti változatosság ellenére azt tapasztalták, hogy a Gly¹¹, Leu¹² és Aib¹³ aminosavak NH csoportjai kialakíthatnak stabil, nem-szokványos H-kötéseket. Hasonló MD szimulációk a fentiekkel egyező megfigyelésekre vezettek az ALM másodlagos szerkezeti elemeire és H-kötés mintázataira vonatkozóan, figyelembe véve mindkét kiindulási szerkezetet [32]. Ezen MD számítások alapján azt állapították meg, hogy a főként α -helikális H-kötés mintázat tartalmaz a 3_{10} -hélixre jellemző H-kötéseket, ugyanakkor pedig konformációs heterogenitást figyeltek meg a Gly¹¹-Pro¹⁴ tetrapeptid egység esetén.

Több MD szimulációt is végeztek különböző körülmények között (úgy mint vízben, metanolban és oktánban; illetve a lipid kettősréteg felszínén és a lipid kettősrétegben) annak érdekében, hogy részletesen tanulmányozzák az ALM térszerkezeti sajátosságait és dinamikus tulajdonságait [33-35]. Ezen MD számítások során az N- és C-terminális régiókban megfigyelhető helikális szerkezetek, valamint a két hélixet összekötő hajlított szerkezet stabilitását és dinamikáját vizsgálták, továbbá a különböző körülmények között megfigyelt konformációkat összehasonlították egymással. A kiindulási α -helikális konformációt kevésbé stabilnak találták vízben, ugyanis a peptid C-terminális része esetén eltűnt a kezdeti helikális szerkezet, és ez a rész egy flexibilis konformációt vett fel, ugyanakkor azonban az N-terminális rész α -helikális maradt. A metanolban megfigyelt, illetve a lipid kettősrétegbe ágyazott szerkezetek sokkal stabilabbnak bizonyultak, mint a vízben azonosított struktúrák. A lipid kettősréteg felszínén kialakuló konformáció esetén azt állapították meg, hogy túlnyomórészt α -helikális szerkezettel jellemezhető, és csak a Gly¹¹-Pro¹⁴ tetrapeptid egység esetén figyeltek meg némi szerkezeti flexibilitást. Oktánban és a víz-oktán határfelületnél az ALM stabil α -helikális szerkezetet vett fel, és csupán kis eltérést tapasztaltak a kiindulási konformációhoz képest.

Harzianinok

A H B-I és H K-VI esetén metanolban elvégzett CD és NMR mérések alapján a β -bend ribbon spirál struktúrát javasolták ezen két molekulára vonatkozóan, amely szerkezetet $1 \leftarrow 4$ H-kötések stabilizálnak [8, 9].

A tizenegy H C peptid esetében metanolban végrehajtott CD és NMR mérések alapján szintén a β -bend ribbon spirál szerkezetet javasolták mint preferált másodlagos szerkezeti elemet, amelyet $1 \leftarrow 4$ H-kötések stabilizálnak [10]. A H C molekulák közül a H C-IX peptid esetén elvégeztek metanolban egy részletes szerkezetvizsgálatot CD és NMR spektroszkópia alkalmazásával, illetve molekulamodellelési számításokat is végrehajtottak [14]. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a H C-IX egy átfedő β -turn-ökből álló helikális struktúrával jellemezhető, amely az Asn² és Leu¹⁴ aminosavak között jelenik meg. Ezt a β -bend ribbon spirál szerkezetet $1 \leftarrow 4$ H-kötések stabilizálják, amelyek közül néhány hiányzik a Pro⁵, Pro⁹ és Pro¹³ aminosavaknak köszönhetően, ugyanis ez a három Pro aminosav megszakítja a kialakuló H-kötés hálózatot.

A H A-V esetén elvégzett CD és NMR mérések eredményei arra a következtetésre vezettek, hogy ez a molekula túlnyomórészt α -helikális szerkezetet vesz fel szerves oldószerben [11]. Mindemellett azonban két torzult régiót is megfigyeltek erre a peptidre vonatkozóan, amelyek közül az egyik az N-terminális részen található 3_{10} - vagy kevert $\alpha/3_{10}$ -turn struktúra, míg a másik a Pro¹³ aminosav körül kialakuló hajlított szerkezet.

Hypomurocinok

A HM A-1 esetén elvégzett NMR mérés azt mutatta, hogy ez a molekula egy kevert helikális konformációt vesz fel dimetil-szulfoxidban, amely α - és 3_{10} -hélixet, valamint I típusú β -turn struktúrát tartalmaz [36]. A micellák jelenlétében végrehajtott NMR mérés eredményei pedig arra a megfigyelésre vezettek, hogy a HM A-1 túlnyomórészt 3_{10} -helikális szerkezettel jellemezhető [36]. A HM A-3 és HM A-5 esetében dimetil-szulfoxidban elvégzett NMR mérések alapján azt állapították meg, hogy ezek a peptidek szintén helikális szerkezettel rendelkeznek [37]. A HM A-1 molekulához hasonlóan ezen két molekula esetén is egy kevert helikális konformációt javasoltak, amely az α - és 3_{10} -hélikális részek mellett I típusú β -turn struktúrát is tartalmaz.

Alkalmazási lehetőségek

Az antimikrobiális rezisztenciának köszönhetően napjainkban egyre nagyobb szükség van különböző, új és hatékony antimikrobiális szerek kifejlesztésére. A peptaibolok biológiai hatása rendkívül széles spektrumban mutatkozik meg, és mindemellett változatos aminosav összetétellel, illetve térszerkezettel rendelkeznek, így ezek a bioaktív molekulák potenciális jelöltek lehetnek ebből a szempontból. Napjainkig már több mint 1000 peptaibol molekulát azonosítottak, és az intenzív kutatások következtében az ismert peptaibolok száma valószínűleg továbbra is növekvő tendenciát mutat majd. Az újonnan izolált bioaktív peptaibol molekulák azonosításával, illetve biológiai és térszerkezeti jellemzésével kapcsolatos kutatási téma rendkívül ígéretes lehet nemcsak abban a tekintetben, hogy új és hatékony, potenciális gyógyszerjelölteket nyújthat a humán gyógyászat számára, hanem abban a tekintetben is, hogy ezek a molekulák potenciális komponensei lehetnek mezőgazdasági alkalmazásokra szánt biokontroll készítményeknek.

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., 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.
- [5] Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vágvölgyi, C., Leitgeb, B. (2013) Recent results in alamethicin research. *Chem Biodivers*, **10**: 744-771.
- [6] Stoppacher, N., Neumann, N. K. N., Burgstaller, L., Zeilinger, S., Degenkolb, T., Brückner, H., Schuhmacher, R. (2013) The comprehensive peptaibiotics database. *Chem Biodivers*, **10**: 734-743.

- [7] Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., Brückner, H. (2003) Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J Pept Sci*, **9**: 799-809.
- [8] Augeven-Bour, I., Rebuffat, S., Auvin, C., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B. (1997) Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1587-1594.
- [9] Rebuffat, S., Hlimi, S., Prigent, Y., Goulard, C., Bodo, B. (1996) Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 2021-2027.
- [10] Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B. (1995) Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1849-1855.
- [11] Rebuffat, S., Duclohier, H., Auvin-Guette, C., Molle, G., Spach, G., Bodo, B. (1992) Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V. *FEMS Microbiol Immunol*, **105**: 151-160.
- [12] Becker, D., Kiess, M., Brückner, H. (1997) Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Ann/Recueil*, 767-772.
- [13] Whitmore, L., Wallace, B. A. (2004) The peptaibol database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acid Res*, **32**: D593-D594.
- [14] Ségalas, I., Prigent, Y., Davoust, D., Bodo, B., Rebuffat, S. (1999) Characterization of a type of β -bend ribbon spiral generated by the repeating (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif: the solution structure of harzianin HC IX, a 14-residue peptaibol forming voltage-dependent ion channels. *Biopolymers*, **50**: 71-85.
- [15] 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.
- [16] Banerjee, U., Tsui, F.-P., Balasubramanian, T. N., Marshall, G. R., Chan, S. I. (1983) Structure of alamethicin in solution: one- and two-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance studies at 500 MHz. *J Mol Biol*, **165**: 757-775.
- [17] Esposito, G., Carver, J. A., Boyd, J., Campbell, I. D. (1987) High-resolution ^1H NMR study of the solution structure of alamethicin. *Biochemistry*, **26**: 1043-1050.
- [18] Yee, A. A., O'Neil, J. D. J. (1992) Uniform ^{15}N labeling of a fungal peptide: the structure and dynamics of an alamethicin by ^{15}N and ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **31**: 3135-3143.

- [19] Franklin, J. C., Ellena, J. F., Jayasinghe, S., Kelsh, L. P., Cafiso, D. S. (1994) Structure of micelle-associated alamethicin from ^1H NMR. Evidence for conformational heterogeneity in a voltage-gated peptide. *Biochemistry*, **33**: 4036-4045.
- [20] Chandrasekhar, K., Das, M. K., Kumar, A., Balaram, P. (1988) Molecular conformation of alamethicin in dimethylsulfoxide solution: a two-dimensional n. m. r. study. *Int J Pept Protein Res*, **32**: 167-174.
- [21] Kelsh, L. P., Ellena, J. F., Cafiso, D. S. (1992) Determination of the molecular dynamics of alamethicin using ^{13}C NMR: implications for the mechanism of gating of a voltage-dependent channel. *Biochemistry*, **31**: 5136-5144.
- [22] Bak, M., Bywater, R. P., Hohwy, M., Thomsen, J. K., Adelhorst, K., Jakobsen, H. J., Sorensen, O. W., Nielsen, N. C. (2001) Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by ^{15}N solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J*, **81**: 1684-1698.
- [23] Yee, A. A., Babiuk, R., O'Neil, J. D. J. (1995) The conformation of an alamethicin in methanol by multinuclear NMR spectroscopy and distance geometry/simulated annealing. *Biopolymers*, **36**: 781-792.
- [24] Dempsey, C. E. (1995) Hydrogen bond stabilities in the isolated alamethicin helix: pH-dependent amide exchange measurements in methanol. *J Am Chem Soc*, **117**: 7526-7534.
- [25] Dempsey, C. E., Handcock, L. J. (1996) Hydrogen bond stabilities in membrane-reconstituted alamethicin from amide-resolved hydrogen-exchange measurements. *Biophys J*, **70**: 1777-1788.
- [26] Vogel, H. (1987) Comparison of the conformation and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes. *Biochemistry*, **26**: 4562-4572.
- [27] Cascio, M., Wallace, B. A. (1988) Conformation of alamethicin in phospholipid vesicles: implications for insertion models. *Proteins*, **4**: 89-98.
- [28] Haris, P. I., Chapman, D. (1988) Fourier transform infrared spectra of the polypeptide alamethicin and a possible structural similarity with bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta*, **943**: 375-380.
- [29] Fraternali, F. (1990) Restrained and unrestrained molecular dynamics simulations in the NVT ensemble of alamethicin. *Biopolymers*, **30**: 1083-1099.
- [30] Biggin, P. C., Breed, J., Son, H. S., Sansom, M. S. (1997) Simulation studies of alamethicin-bilayer interactions. *Biophys J*, **72**: 627-636.
- [31] Gibbs, N., Sessions, R. B., Williams, P. B., Dempsey, C. E. (1997) Helix bending in alamethicin: molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange in methanol. *Biophys J*, **72**: 2490-2495.

- [32] Sessions, R. B., Gibbs, N., Dempsey, C. E. (1998) Hydrogen bonding in helical polypeptides from molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange analysis: alamethicin and melittin in methanol. *Biophys J*, **74**: 138-152.
- [33] Tieleman, D. P., Sansom, M. S. P., Berendsen, H. J. C. (1999) Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **76**: 40-49.
- [34] Tieleman, D. P., Berendsen, H. J. C., Sansom, M. S. P. (1999) Surface binding of alamethicin stabilizes its helical structure: molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **76**: 3186-3191.
- [35] Tieleman, D. P., Berendsen, H. J. C., Sansom, M. S. P. (2001) Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophys J*, **80**: 331-346.
- [36] Pradeille, N., Zerbe, O., Möhle, K., Linden, A., Heimgartner, H. (2005) The first total synthesis of the peptaibol hypomurocin A1 and its conformational analysis: an application of the 'azirine/oxazolone method'. *Chem Biodivers*, **2**: 1127-1152.
- [37] Pradeille, N., Tzouros, M., Möhle, K., Linden, A., Heimgartner, H. (2012) Total synthesis of the peptaibols hypomurocin A3 and hypomurocin A5, and their conformational analysis. *Chem Biodivers*, **9**: 2528-2558.



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 peptidek térszerkezetének, folding folyamatainak, szerkezet-aktivitás összefüggéseinek és hatásmechanizmusának tanulmányozása molekulamodellelési módszerek alkalmazásával.