

УДК 577.112.083; 577.29

Димеризация антимикробного пептида полифемузина I в единую полипептидную цепь: теоретические и практические следствия

© 2019 М.С. ЮРКОВА^{1,2}, В.А. ЗЕНИН^{1,2}, Э.Г. САДЫХОВ¹, А.Н. ФЕДОРОВ^{1,2,*}¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071²Российский университет дружбы народов, Москва, 117198

*e-mail: a.fedorov@fbras.ru

Поступила в редакцию 14.08.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 13.09.2019 г.

Изучение антимикробных пептидов (АМП), которые рассматриваются как источник новых антибиотиков, в последнее время привлекает к себе все больше внимания. АМП объединяют несколько больших групп пептидов с разным спектром и различными механизмами действия на бактериальные клетки. Более изученными являются пептиды, образующие альфа-спирали; для пептидов, образующих бета-структуры, механизмы их антимикробного действия изучены в меньшей степени. Для практического применения АМП желательнее дальнейшее повышение их бактерицидного эффекта. Одной из применяемых стратегий повышения бактерицидного эффекта является димеризация АМП, которая обычно осуществляется химической конъюгацией мономеров. В данной работе была применена стратегия последовательной димеризации мономеров в единую полипептидную цепь на примере бета-структурированного АМП полифемузина I. Полифемузин I является одним из наиболее эффективных АМП и, соответственно, кандидатом для практического использования в качестве антибиотика. Описано несколько вероятных механизмов его действия, наиболее разработанными из которых являются формирование пор в клеточной мембране и транслокация через мембрану без ее выраженных повреждений. Эти механизмы по-разному предсказывают влияние димеризации полифемузина I на его бактерицидные свойства. В данной статье методами молекулярного моделирования были проанализированы возможные структуры мономера и димера полифемузина I в липидной мембране. Методом химического синтеза получены мономер и димер полифемузина I, в котором два мономера соединены последовательно через гибкий линкер в единую полипептидную цепь. Проведена количественная оценка антимикробного действия мономера и димера на разных бактериальных культурах, показано, что отличий не наблюдается. Объединяя результаты молекулярного моделирования и лабораторных исследований, можно сделать вывод, что формирование пор не является вероятным механизмом действия полифемузина I.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, димеризация пептидов, механизм антимикробного действия, полифемузин I.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-36-41

Внимание к изучению антимикробных пептидов (АМП), обусловлено тем, что АМП считаются потенциальными кандидатами для преодоления проблемы множественной лекарственной устойчивости. Возрастает как количество обнаруженных АМП, так и число исследований, посвя-

щенных изучению механизмов их действия. До сих пор нет единого мнения по поводу молекулярных механизмов их действия.

Большинство АМП – положительно заряженные короткие пептиды. Для некоторых АМП было показано, что они проникают в цитоплазму кишечной

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки, АМП – антимикробные пептиды; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; CLSI – стандарты Clinical and Laboratory Standards Institute.

палочки дикого типа без существенного повреждения мембраны и вызывают дезорганизацию цитоплазматических структур [1]. В своей работе Ulmschneider [2] описал механизм мембранной транслокации заряженного пептида. Для многих АМП увеличение проницаемости мембраны связано либо с разрушением мембраны (детергентный механизм), либо с образованием пор. Механизмы образования пор активно исследуются, в том числе с применением компьютерного моделирования [3–5]. Известны две модели образования пор – цилиндрическая пора или тороидальная пора. Пептиды, для которых было экспериментально доказано, что механизмом их действия является образование пор, имеют в основном альфа-спиральную структуру. О взаимодействии с липидными бислоями бета-структурированных пептидов, которые включают в себя ретроциклин тета-дефенсин [6], тахиплезин [7], полифемузин [8], гомезин [9] и андроктонин [10], имеется меньше информации [11]. Молекулярное моделирование образования пор, проведенное для бета-структурированных АМП и некоторых синтетических пептидов, выявило разнообразие в их поведении, и поставило под сомнение действие механизмов образования цилиндрической и полу-цилиндрической поры для всего семейства бета-структурированных АМП [12]. Теоретически, для формирования цилиндрической поры требуется восемь бета-структурированных пептидов, а для формирования дуги (полуцилиндра) – четыре. В обоих случаях формированию пор может способствовать димеризация пептида.

Для повышения бактерицидного эффекта АМП иногда применяют стратегию димеризации, однако, экспериментальные данные показывают, что димеризация не всегда повышает антимикробную активность. В обзоре [13] рассматриваются работы по димеризации и соответствующему повышению или понижению биологической активности АМП, и сделан вывод о необходимости дальнейших исследований для выяснения связи между димеризацией и свойствами пептидов.

Цель работы – изучение влияния последовательной димеризации на антимикробную активность полифемузина I.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Полифемузин I – один из самых действенных из известных пептидных антибиотиков, он состоит из 18 аминокислотных остатков (а.о.), четыре из которых являются остатками цистеина, необхо-

димыми для поддержания структуры пептида [14]. В литературе нет единого мнения относительно механизма действия полифемузина I. Имеются данные о его транслокации в цитоплазму без существенного повреждения мембраны [8], с другой стороны, для бета-структурированных пептидов была также продемонстрирована возможность образования пор [12].

Последовательности химически синтезированных полифемузина и его димера

Полифемузин I (rrwcfrcvrgfgyrker, 18 а.о.) и его димер (rrwcfrcvrgfgyrkergrsgrrwcfrcvrgfgyrker) 39 а.о.) были получены химическим синтезом (Genecust, Люксембург). В димере два мономера соединены последовательно с помощью гибкого линкера из трех аминокислотных остатков (gsg).

Определение минимальной ингибирующей концентрации [15, 16]

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) определяется как самая низкая концентрация антимикробного агента, способная ингибировать видимый рост микроорганизма после инкубации в течение ночи. Определение МИК проводили, руководствуясь стандартами CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), с использованием метода макроразведения в среде Мюллера-Хинтона. Были использованы два типа стандартных контрольных клеток, *E. coli* UB1005 (грамотрицательные) и *S. aureus* 209P (грамположительные). Исходная концентрация клеток была 5×10^5 КОЕ/мл. Полифемузин I и его димер были добавлены к клеткам в двукратных последовательных разведениях; самой низкой из использованных концентраций была 0,125 мкМ, что соответствует 0,3 мкг/мл для полифемузина I и 0,6 мкг/мл для димера полифемузина I. Каждая экспериментальная точка была сделана в трех повторях. Представленные в работе результаты получены в трех независимых экспериментах.

Молекулярная динамика

Начальная конформация полифемузина была взята из ЯМП-структуры полифемузина I (PDB ID 1RKK) [8]. Гомологичное моделирование структуры димерного полифемузина на основе ЯМП-структуры полифемузина I было проведено при помощи программы MODELLER 9.15 [17], использовался алгоритм для улучшения положения петель. Расчет молекулярной динамики мономерного и димерного полифемузина I проводился как в водной среде, так и в системе с мембраной

из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) в пакете программ GROMACS 4.6.5. Все молекулярные симуляции проводились в силовом поле GROMOS96 53A6. Для моделирования структуры воды использовалась SPC-модель, интеграция проводилась с шагом в 1 фс, суммарное время симуляции составляло 80 фс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе стратегия димеризации в единую полипептидную цепь была применена к антимикробному пептиду полифемузину I. Для полифемузина I нет согласованной концепции относительно механизма его действия. Имеются данные как за [12, 18], так и против [1] его участия в формировании пор в клеточной мембране. В случае формирования пор несколько пептидов должны образовать организованную структуру. Этот процесс зависит от концентрации и, следовательно, димеризация должна способствовать его ускорению. Димеризацию и ранее применяли по отношению к АМП, стремясь увеличить их антимикробную активность. Для одних пептидов данная стратегия была успешной, у других антимикробная активность снижалась. В большей части работ из обзора [13] проводили химическую димеризацию мономеров пептида, соединяя попарно либо их N-, либо C-концы. В таком случае мономеры оказывались ориентированы параллельно по отношению друг к другу. Подобный конструкт не может быть получен биосинтетическим путем. Нами же ведется разработка способа получения токсических пептидов в клетке без ограничения их размера. В случае биосинтетического получения пептида димеризация может способствовать повышению выхода конечного продукта и антимикробной активности пептида. Для полифемузина I литературных данных об антимикробной активности димера нет.

Итак, в данной работе в димере полифемузина I мономеры были соединены последовательно, через короткий гибкий линкер, состоящий из трех аминокислотных остатков (см. Условия эксперимента). И полифемузин I, и его димер были получены химическим синтезом.

Моделирование димера полифемузина I

Перед началом лабораторных исследований было проведено молекулярное моделирование структуры димера полифемузина I в фосфолипидной мембране, состоящей из дипальмитоилфос-

фатидилхолина (DPPC). На рис. 1 представлены результаты моделирования в сравнении с известной структурой мономера полифемузина I [8].

Структура димера полифемузина I такова, что N-концы обоих мономеров в его составе сближены и их заряды объединены, так что общее распределение заряда в молекуле схоже с таковым в молекуле мономера полифемузина I. Расчет среднеквадратичных флуктуаций для каждого аминокислотного остатка (рис. 2) показывает, что подвижность N-концевых аминокислотных остатков каждого мономера в составе димера полифемузина I (черные столбики) снижена по сравнению с мономером полифемузина I (серые столбики), что свидетельствует о том, что их положение более жестко фиксировано.

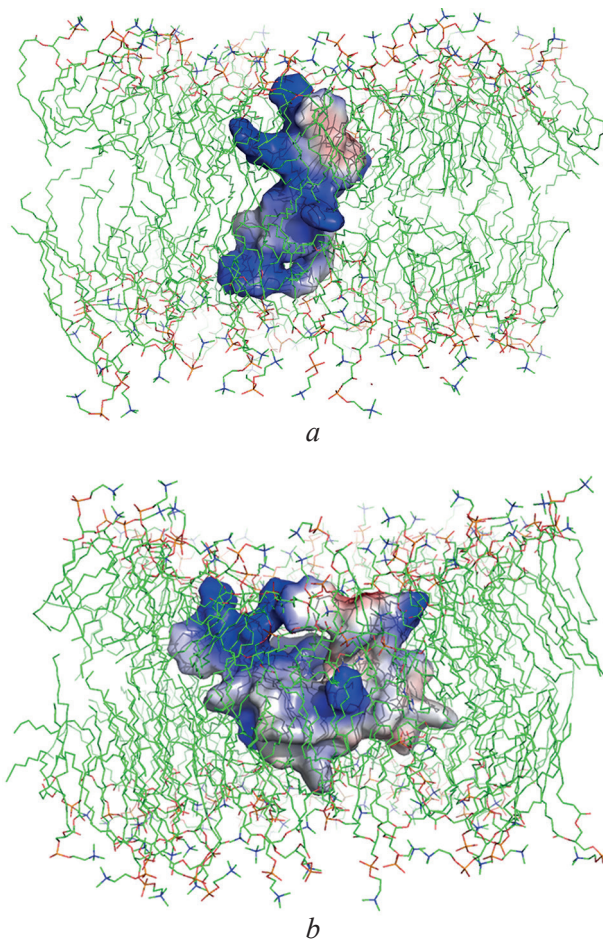


Рис. 1. Структура мономера (a) [8] и димера (b) полифемузина I в фосфолипидной мембране, состоящей из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), с электростатической картой. Синим показан положительно заряженный N-концевой фрагмент (Arg1-Arg5)

Fig. 1. The structure of the monomer (a) [8] and the dimer (b) of polyphemusin I in phospholipid membrane consisting of dipalmitoylphosphatidyl choline (DPPC), with electrostatic chart. The positively charged N-terminal fragment (Arg1-Arg5) is shown in blue

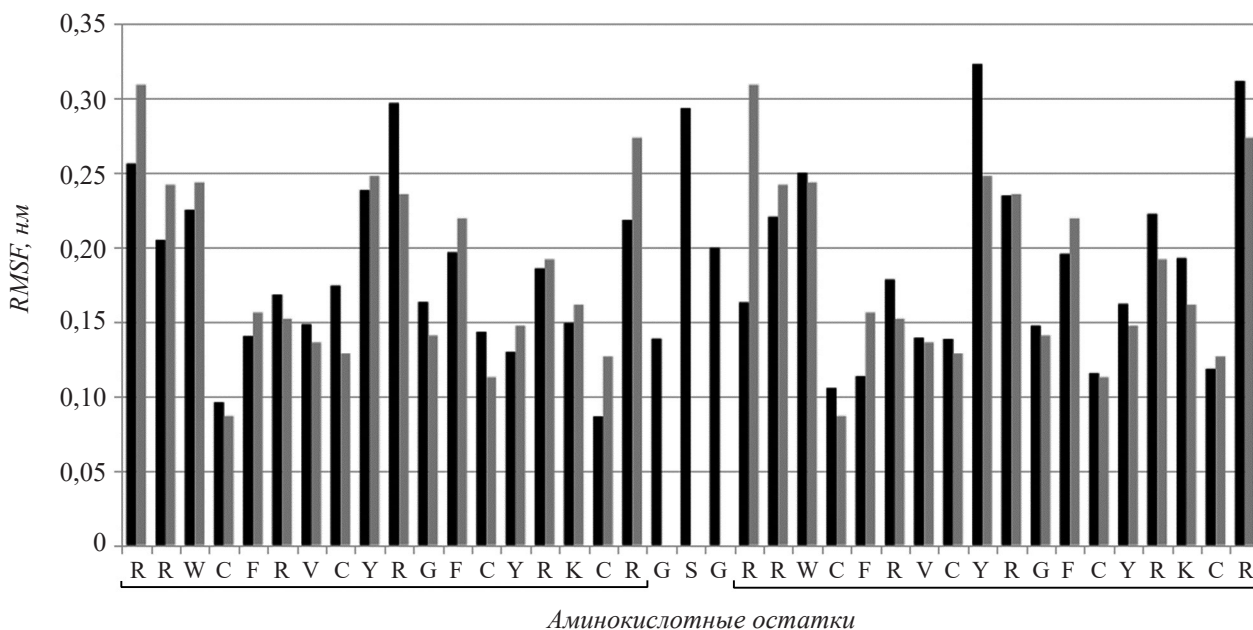


Рис. 2. Среднеквадратичное отклонение (RMSF, root mean square fluctuation) по аминокислотным остаткам для мономера и димера полифемузина I. Черным показано среднеквадратичное отклонение для димера, серым – для мономера по соответствующим аминокислотным остаткам

Fig. 2. Standard deviations by amino acid residues for the monomer and the dimer of polyphemusin I. Standard deviations for the dimer are shown in black, for the monomer in gray for each corresponding amino acid residue

Оценка антимикробной активности

МИК позволяет количественно оценить бактериостатическое действие агента. Методы разведения (жидкой среды или агара) считаются наиболее подходящими для определения значения МИК [19].

Известно, что на получаемые экспериментально значения МИК могут повлиять многие факторы, такие, как тип питательной среды, метод приготовления и объем инокулята, время инкубации и др. Задачей данной работы было сравнение значений МИК для полифемузина I и его димера в одинаковых экспериментальных условиях, однако, соблюдение утвержденных CLSI-стандартов для определения антимикробной активности [15] (см. Условия эксперимента) позволяет также соотнести полученные данные с литературными.

Полифемузин I и его димер были добавлены к клеткам в двукратных последовательных разведениях, и наименьшая концентрация, при которой не наблюдался рост клеток после ночи инкубации при 37 °С, была принята за МИК. В табл. 1 приведены результаты, полученные в трех независимых экспериментах.

Величина МИК, выраженная в молярности, для димера и мономера полифемузина I оказалась одинаковой. Для мономера эта величина близка к при-

водимой в работах других авторов [1, 8, 20]. Принимая во внимание данный результат, был сделан вывод, что при антибактериальном воздействии поведение димера полифемузина I очень сходно с поведением мономера. Образование структур для формирования пор является концентрационно-зависимым процессом. Следовательно, димеризация полифемузина I могла бы привести к понижению МИК при условии, что механизмом действия полифемузина I является формирование пор [11]. Полученный результат не подтверждает такого предположения. С другой стороны, результат согласуется с выводами предыдущих работ по изучению молекулярной динамики пептидов с бета-структурой, где было показано, что олигомеризация полифемузина I не вносит существенного вклада в снижение свободной энергии, в отличие от других АМП [12].

Таблица 1

Значения МИК для полифемузина I и его димера
Values of MIC for polyphasia I and its dimer

Организм	Грам	МИК, мкМ (мкг/мл)	
		Полифемузин I	Димер полифемузина I
<i>E. coli</i>	-	0,5 (1,25)	0,5 (2,5)
<i>S. aureus 209P</i>	+	1 (2,5)	1 (5)

Альтернативным механизмом действия полифемузина I является проникновение в клетку без заметных повреждений мембраны и дезорганизация цитоплазматических структур [1]. Механизм подобной транслокации был предложен для полифемузина I [21], а также разработан с помощью молекулярного моделирования для описания общего случая проникновения заряженных пептидов через мембрану [2]. В случае транслокации пептиду необходимо иметь неограниченную подвижность N-концевого положительно заряженного фрагмента; также такой механизм предусматривает возможность диссоциации и изменения взаимного расположения мономеров полифемузина I в процессе их продвижения через мембрану [21]. В составе димера мономеры такой возможности не имеют. Молекулярное моделирование димера полифемузина I показало сближение N-концевых положительно заряженных фрагментов исходных мономеров таким образом, что положительный заряд преимущественно локализован в одном конце молекулы, что делает электростатические карты мономера и димера схожими. Кроме того, согласно результатам лабораторных исследований, димеризация полифемузина I не приводит к изменению МИК.

Все полученные результаты в совокупности позволяют сделать вывод, что при проникновении в клетку димер ведет себя, как одна молекула полифемузина I, что согласуется с теорией транслокации. Таким образом, последовательная димеризация полифемузина I не привела к повышению его антимикробной активности, но позволила прояснить механизм его действия. Димеризация пептидов является многообещающей стратегией, и, поскольку нет общей концепции по поводу ее последствий для эффективности АМП, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, уникальный идентификатор работы (проекта) RFMEFI57517X0151.

ЛИТЕРАТУРА

1. Powers J.-P.S., Martin M.M., Goosney D.L., Hancock R.E.W. The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50(4), 1522–1524. doi: 10.1128/AAC.50.4.1522-1524.2006
2. Ulmschneider J.P. Charged Antimicrobial peptides can translocate across membranes without forming channel-like pores. *Biophys. J.*, 2017, 113(1), 73–81. doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.056
3. Bolintineanu D.S., Kaznessis Y.N. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review. *Peptides*, 2011, 32(1), 188–201. doi: 10.1016/j.peptides.2010.10.006
4. Prieto L., He Y., Lazaridis T. Protein arcs may form stable pores in lipid membranes. *Biophys. J.*, 2014 106(1), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4490>
5. Sahoo B.R., Fujiwara T. Membrane mediated antimicrobial and antitumor activity of cathelicidin 6: Structural insights from molecular dynamics simulation on multi-microsecond scale. *PloS One*, 2016, 11(7), e0158702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158702>
6. Lehrer R.I., Cole A.M., Selsted M.E. θ -Defensins: cyclic peptides with endless potential. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(32), 27014–27019. doi: 10.1074/jbc.R112.346098
7. Laederach A., Andreotti A.H., Fulton D.B. Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives. *Biochemistry*, 2002 41(41), 12359–12368. <https://doi.org/10.1021/bi026185z>
8. Powers J.-P.S., Rozek A., Hancock R.E.W. Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1698(2), 239–250. doi: 10.1016/j.bbapap.2003.12.009
9. Mandard N., Bulet P., Caille A., et al. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269(4), 1190–1198. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02760.x>
10. Mandard N., Sy D., Maufrais C., Bonmatin, et al. Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1999, 17(2), 367–380. doi: 10.1080/07391102.1999.10508368
11. Ermakova E., Kurbanov R., Zuev Y. Coarse-grained molecular dynamics of membrane semitoroidal pore formation in model lipid-peptide systems. *J. Mol. Graph. Model.*, 2019, 87, 1–10. doi: 10.1016/j.jmgm.2018.11.003
12. Lipkin R.B., Lazaridis T. Implicit membrane investigation of the stability of antimicrobial peptide β -barrels and arcs. *J. Membr. Biol.*, 2015, 248(3), 469–486. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9759-4>
13. Lorenzon E.N., Piccoli J.P., Santos-Filho N.A., Cilli E.M. Dimerization of antimicrobial peptides: A promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. *Protein Pept. Lett.*, 2019, 26(2), 98–107. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190102125304>
14. Castro J.R.M., Fuzo C.A., Degrève L. Effect of disulfide bridges deletion on the conformation of the androctonin, polyphemusin-I, and thanatin antimicrobial peptides: molecular dynamics simulation studies. *J. Biophys. Chem.* 2011, 2(3), 244–257. doi: 10.4236/jbpc.2011.23030

15. Cockerill F. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015, 5–87.
16. Andrews J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 48(Suppl. 1), 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.5
17. Webb B., Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.*, 2016, 54, 5.6.1–5.6.37. doi: 10.1002/cpbi.3
18. Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., et al. Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. *ACS Infect Dis.*, 2016, 2(6), 442–450. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00045
19. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.*, 2016, 6(2), 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
20. Marggraf M.B., Pantelev P.V., Emelianova A.A., et al. Cytotoxic potential of the novel horseshoe crab peptide polyphemusin III. *Mar. Drugs.*, 2018, 16(12), 466, 1–19. doi: 10.3390/md16120466
21. Powers J.-P.S., Tan A., Ramamoorthy A., Hancock, R.E.W. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*, 2005, 44(47), 15504–15513. doi: 10.1021/bi051302m

Dimerization of the Antimicrobial Peptide Polyphemusin I into One Polypeptide Chain: Theoretical and Practical Consequences

M.S. YURKOVA^{1,2}, V.A. ZENIN^{1,2}, E.G. SADYKHOV¹, and A.N. FEDOROV^{1,2,*}

¹*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow Russia*

²*Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow Russia*

*e-mail: a.fedorov@fbras.ru

Received August 14, 2019

Revised September 2, 2019

Accepted September 13, 2019

Abstract—A strategy of sequential dimerization of monomers of antimicrobial peptides (AMPs) into one polypeptide chain has been implemented on the example of a beta-structural AMP polyphemusin I which is one of the most effective candidate for use as an antibiotic. The possible polyphemusin I monomer and dimer structures in lipid membrane were studied in this work via molecular modeling. To this end, these molecules were chemically synthesized so that the dimer represented two monomers connected in series into one polypeptide chain with a flexible linker. The antimicrobial effects of monomer and dimer were then tested on various bacterial cultures, and their similarity was shown. Therefore, we can conclude that the pore formation is not a putative mechanism of the polyphemusin I action.

Key words: antimicrobial peptides, peptide dimerization, mechanism of antimicrobial action, polyphemusin

Funding—The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project Unique Identifier RFMEFI57517X0151).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-36-41