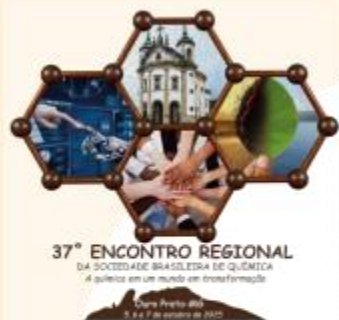




Estudos de conformação e interação peptídeo membrana entre os derivados encurtados LyeTx I mn Δ K e LyeTx I mn Δ K(L)

Wanderson A. B. Cândido^{*}(G), Amanda N. de Souza¹(PG), Rodrigo M. Verly¹(PQ)

¹Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri, FACET, Diamantina, MG, Brasil, 39100-000.

*e-mail: wanderson.aparecido@ufvjm.edu.br

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos são promissores na busca por novos antibióticos por possuírem mecanismos de ação distintos dos antibióticos tradicionais e seletividade por células microbianas. O peptídeo LyeTx I, isolado da toxina da aranha *Lycosa erythrognatha*, foi estudado por seu potencial antimicrobiano. Este trabalho foca na comparação entre os derivados encurtados LyeTx I mn Δ K(L) e LyeTx I mn Δ K com foco nos estudos de conformação e interação peptídeo membrana. Os resultados mostraram que a síntese do LyeTx I mn Δ K(L) foi bem sucedida e a adição do resíduo de Leucina resultou em melhoras moderadas nos estudos conformação e na interação com meios miméticos de membrana.

Peptídeo antimicrobiano, biomoléculas, *Lycosa erythrognatha*

Introdução

Os peptídeos são biomoléculas compostas por 2 a 100 resíduos de aminoácidos, que se conectam por meio de uma ligação amídica, também denominada de ligação peptídica. Essas ligações resultam da reação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amino de outro. Diversos organismos apresentam os peptídeos em sua composição, por exemplo, peixes, anfíbios, mamíferos, bactérias, fungos, plantas e insetos. A aranha de jardim *Lycosa erythrognatha* é um animal que produz, em sua toxina, o peptídeo LyeTx I, composto por 25 resíduos de aminoácidos. A partir desse peptídeo natural, diferentes versões sintéticas minimizadas têm sido desenvolvidas, como o LyeTx I mn Δ K (IWLTALKFLGKLNGLK-NH₂) e, no presente trabalho, o novo derivado LyeTx I mn Δ K(L), no qual um resíduo adicional de leucina foi incorporado ao final da porção C-terminal (IWLTALKFLGKLNGLK-NH₂).

Experimental

Síntese e purificação dos peptídeos.

Os peptídeos LyeTx I mn Δ K(L) foram sintetizados manualmente por meio da estratégia de síntese peptídica em fase sólida utilizando a estratégia *Fmoc* (9-fluorenilmetiloxycarbonila). Para ambos, foi utilizada uma resina Rink-amida com grau de substituição de 0,60 mmol·g⁻¹. As etapas de acoplamento foram realizadas em solução de 1,5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF), contendo os agentes ativadores 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), sob agitação constante a 240 rpm durante 2 horas. A remoção dos grupos protetores foi conduzida com solução de 4-metilpiperidina em DMF (25% v/v), em dois ciclos de 15 minutos cada. A clivagem dos peptídeos da resina foi realizada utilizando uma solução de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano e água (95:2,5:2,5, v/v/v), sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, os peptídeos foram

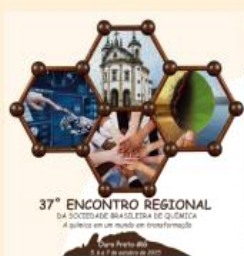
precipitados com éter diisopropílico, dissolvidos em água e liofilizados. As etapas de acoplamento e desproteção foram monitoradas qualitativamente por meio do teste colorimétrico de Kaiser.

Potencial zeta (ζ) e diâmetro hidrodinâmico.

Para investigar a interação entre o peptídeo e membrana, foram realizadas análises do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do potencial zeta (ζ -potencial), utilizando vesículas unilamelares grandes (LUVs) como modelo de membrana. As LUVs foram preparadas a partir de uma mistura lipídica composta por 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfoglicerol (POPG)(3:1, mol:mol) em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Foi adicionada a vesícula na cubeta em seguida e o peptídeo foi adicionado progressivamente em forma de titulação nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 15 μ M. Os procedimentos foram realizados com ambos os peptídeos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, assegurando a reprodutibilidade e a confiabilidade dos dados obtidos.

Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

Para investigar a interação do peptídeo LyeTx I mn Δ K(L) com ambientes miméticos de membrana, empregou-se a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A titulação para o peptídeo LyeTx I mn Δ K(L) foi realizada com 30 injeções sucessivas de 5 μ L de uma solução a 50 μ M, em (LUVs) de POPC:POPG (3:1, mol:mol) a 20 mM, preparadas em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), a 30 °C (303,15 K). Cada injeção teve duração de 2 segundos, com intervalos de 250 segundos. Para o peptídeo LyeTx I mn Δ K, as titulações seguiram o mesmo protocolo, diferindo apenas nas condições: utilizou-se solução a 25 μ M, em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), a 35 °C (308,15 K).



Dicroísmo circular.

Os estudos conformacionais dos peptídeos LyeTx I mnΔK(L) e LyeTx I mnΔK foram realizados por meio de dicroísmo circular (CD), na presença de vesículas de POPC:POPG (3:1, mol:mol), em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5). As amostras foram preparadas contendo 50 μM do peptídeo, com diferentes concentrações de fosfolípidios a 25 °C. Experimentos semelhantes foram conduzidos com o peptídeo em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), na ausência de vesículas.

Resultados e Discussão

Efeito do peptídeo no diâmetro hidrodinâmico (D_h) e no potencial zeta (ζ) das LUVs de POPC:POPG.

Os resultados de espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram alterações tanto no diâmetro hidrodinâmico quanto no potencial zeta, de forma proporcional à concentração do peptídeo indicando a agregação do peptídeo a superfície da vesícula.

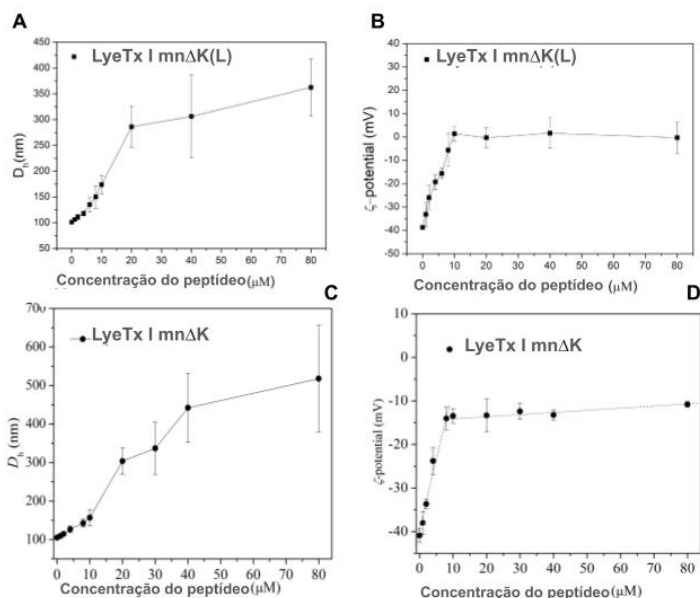


Figura 1: Variação de (A) diâmetro hidrodinâmico e (B) potencial zeta de LUVs POPC:POPG 500 μM (3:1, mol:mol) com a titulação da solução LyeTx I mnΔK(L). Variação de (C) diâmetro hidrodinâmico e (D) potencial zeta de LUVs POPC:POPG 500 μM (3:1, mol:mol) com a titulação de LyeTx I mnΔK em temperatura de 25 °C.

Avaliação conformacional

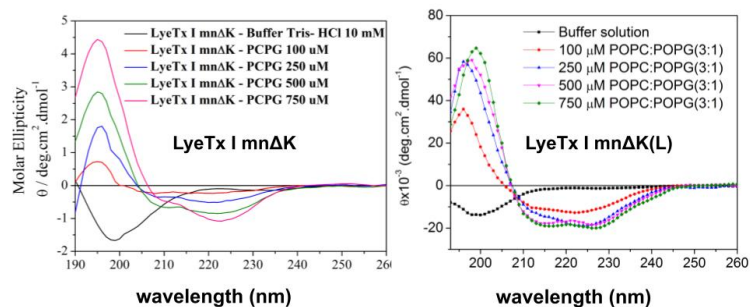


Figura 2: Espectros de dicroísmo circular(CD) dos peptídeos LyeTx I mnΔK e LyeTx I mnΔK(L) em solução tampão Tris-HCl pH 7,5 e em diferentes concentrações de LUVs de POPC:POPG (3:1) mol/mol.

Calorimetria de titulação isotérmica

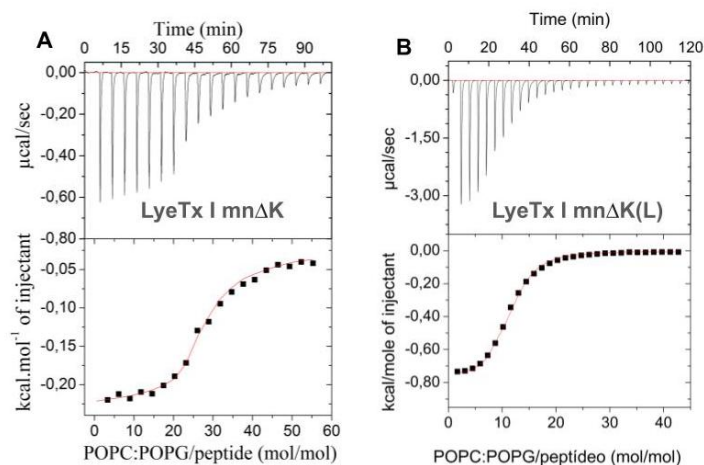


Figura 3: A) Isothermas obtidas a partir da titulação de soluções de 20 mM POPC:POPG (3:1) no peptídeo LyeTx I mnΔK 25 μM em solução tampão Tris-HCl pH 8,0 a 35 °C. B) obtidas a partir da titulação de soluções de 20 mM POPC:POPG (3:1) no peptídeo LyeTx I mnΔK(L) 50 μM em solução tampão Tris-HCl pH 7,5 a 30 °C.

Tabela 1: Parâmetros termodinâmicos obtidos após as titulações.

Peptídeos	n	K_{app} (L.mol ⁻¹)	ΔG° (cal.mol ⁻¹)	ΔH° (cal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹)
LyeTx I mnΔK	24,8 ± 0,8	2,0 x 10 ⁴ ± 1,3 x 10 ³	- 6039	-215 ± 8	18,9
LyeTx I mnΔK(L)	11,5 ± 0,3	3,9 x 10 ⁴ ± 7x10 ³	-6373	735 ± 20	18,6

Os dados de DLS e potencial zeta indicaram que o peptídeo possui afinidade por membranas aniônicas, evidenciando sua seletividade por membranas de bactéria. Esses resultados são consistentes com os estudos conformacionais, que demonstram um aumento moderado na intensidade dos picos característicos de α -hélice na estrutura do LyeTx I mnΔK(L) em comparação ao LyeTx I mnΔK no mesmo meio mimético (POPC:POPG, 3:1), conforme observado por espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Além disso, os dados obtidos por titulação calorimétrica isotérmica (ITC) corroboram esses resultados, evidenciando uma interação termodinamicamente favorável. Observou-se um aumento nos valores da constante de associação aparente (K_{app}) e um ΔG° mais negativo em comparação ao LyeTx I mnΔK.

Conclusões

Os resultados mostraram que a síntese do LyeTx I mnΔK(L) foi bem sucedida e a adição do resíduo de Leucina resultou em melhoras tanto nos estudos conformacionais quanto na interação com meios miméticos de membrana aniônicos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela UFVJM, CAPES, CNPq, FAPEMIG e CAPES-COFECUB.

Referências

- Fuscaldi L.L, de Avelar Júnior J.T, Dos Santos D.M, et al. Shortened derivatives from native antimicrobial peptide LyeTx I: In vitro and in vivo biological activity assessment. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021, 246(4), 414-425.
- CHAN, W.C.; WHITE, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. Oxford University Press, Ed. 1, Inglaterra, 2000.

