

ARGOMENTO

Meccanismi di azione di peptidi pore-forming e potenzialità della biofisica

Valeria Conti Nibali¹
Giovanna D'Angelo¹
Ulderico Wanderlingh¹
Roberto Conti Nibali²

1. Dipartimento di Fisica,
Università di Messina
2. Clinica Pediatrica,
Università di Messina

ABSTRACT

Potentialities of biophysics in the study of the mechanism of action of pore-forming peptides.

The pore-forming proteins and peptides (PFP) peculiarity of creating a pathway for water-soluble molecules through the cell membrane attracts great interest in medical area: potential applications include antibiotics, antitumoral agents, drug transport and delivery systems. The highly interdisciplinary nature of this research requires the cooperation of several scientific fields, by the exchange of knowledges and common research projects. In this contribution, a biophysical study about the influence of a PFP, gramicidin D, on a model membrane, DMPC – performed through neutron scattering and molecular dynamics techniques – is presented. The obtained results highlight the potentialities of these methodologies in the investigation of this kind of systems.

► **Key words.** *Biophysics | membranes | pore-forming proteins | molecular dynamics | neutron spectroscopy.*

RIASSUNTO

La capacità delle proteine e dei peptidi pore-forming (PFP) di creare un percorso per le molecole idrosolubili attraverso la membrana cellulare suscita un notevole interesse in campo medico: tra le possibili applicazioni, vi sono antibiotici, agenti antitumorali, sistemi di trasporto e rilascio di farmaci. Questa ricerca presenta un carattere altamente interdisciplinare che richiede l'integrazione di competenze relative a differenti settori scientifici, attraverso scambi intensi e progetti di ricerca comuni. In questo lavoro viene presentato uno studio biofisico riguardante gli effetti di un PFP, la gramicidina D, su una membrana modello, DMPC, condotto con le tecniche di spettroscopia neutronica e di dinamica molecolare. I risultati ottenuti mettono in luce le potenzialità di queste metodologie di indagine nello studio di questo tipo di sistemi.

► **Parole chiave.** *Biofisica | membrane | proteine pore-forming | spettroscopia neutronica | dinamica molecolare.*

ARGOMENTO

CARATTERISTICHE DI UN PEPTIDE PORE-FORMING

Le proteine e i peptidi che formano pori e canali ionici transmembrana (*pore-forming proteins and peptides*, PFP) comprendono diverse classi di molecole che vanno da corti peptidi che permettono un passaggio non selettivo di molecole, a grossi canali ionici la cui funzione è strettamente controllata da fattori di regolazione o meccanismi di segnale. Più dettagliatamente, i canali ionici si distinguono per la loro specificità per un particolare ione da cui spesso prendono il nome (per es. il canale del K⁺) e per la capacità di aprirsi e chiudersi, spesso regolata da determinati stimoli, in base ai quali vengono anche classificati (per es. canali a controllo di ligando o a controllo di potenziale). I pori tendono invece a essere meno selettivi, possono essere permeabili anche a molecole non ioniche e spesso mancano di meccanismi di controllo che regolino il passaggio di molecole¹. I PFP hanno in comune la caratteristica di creare un passaggio per molecole idrosolubili che non possono normalmente attraversare il doppio strato della membrana plasmatica; quest'ultima è composta principalmente da fosfolipidi, la cui struttura è costituita da un ponte fosfato che lega un'unità polare (idrofilica) a catene idrocarburiche apolari (idrofobiche). In un doppio strato le molecole si orientano in modo che le catene idrocarburiche si associno in una regione non polare, rivolta verso l'interno della struttura, mentre i gruppi idrofilici siano esposti verso l'ambiente polare.

I PFP comprendono diverse classi di molecole.

POSSIBILI APPLICAZIONI MEDICHE DEI PEPTIDI PORE-FORMING

Una frazione significativa della ricerca di base è rivolta alla delucidazione della struttura dei PFP e alla comprensione dei meccanismi chiave della relazione tra struttura e funzione. L'identificazione di motivi strutturalmente rilevanti dei PFP permette di progettare pori sintetici con funzioni specifiche e di valore terapeutico. Un altro possibile approccio è quello di sfruttare direttamente le proprietà "innate" dei PFP, senza apportare alcuna modifica alle molecole. Tra le potenziali applicazioni, l'individuazione di cellule specifiche da parte dei PFP (*targeting*) è un obiettivo chiave nella realizzazione di **agenti antitumorali**. Le cellule maligne spesso esibiscono un numero elevato di specifici antigeni tumorali o recettori di fattori di crescita sulla superficie cellulare. PFP possono essere progettati per colpire queste cellule sostituendo un dominio di legame originario dei PFP con ligandi specifici o anticorpi, oppure unendoli ad essi. Inoltre, si può sfruttare la caratteristica delle cellule cancerogene di esprimere proteasi associate al tumore. Specifici siti di clivaggio introdotti in una data regione del PFP possono essere utilizzati come inneschi per attivare il poro solo in corrispondenza di tale tipo di cellula.

Tra le possibili applicazioni mediche dei PFP la realizzazione di agenti antitumorali.

Un ulteriore obiettivo è quello di controllare il passaggio di molecole attraverso un PFP mediante uno stimolo appropriato di natura chimica o fisica, come ad esempio la variazione del pH, o un flash luminoso; si cerca inoltre di chiarire i meccanismi della conduttanza (quanto rapidamente una specie permeante si muove) e della selettività (quali specie riescono a passare nei PFP). La manipolazione della selettività di un poro ed il controllo del *gating* sono obiettivi chiave per le applicazioni mediche e biotecnologiche.

Un'altra importante applicazione dei PFP è legata al rilascio di farmaci. Farmaci, enzimi e sostanze terapeutiche potrebbero essere incapsulate in liposomi contenenti pori artificiali ed in seguito rilasciate, con l'ausilio di appropriate tecniche di innesco progettate per i pori. Un tale sistema fornirebbe un livello di controllo sui tempi, i modi e le quantità dei farmaci rilasciati.

Inoltre, i PFP sono applicabili nel rilascio di farmaci e hanno carattere anti-microbico.

Inoltre, i PFP presentano un carattere anti-microbico. Si ritiene che la proprietà battericida dei PFP sia legata alla loro capacità di assemblarsi nella membrana bersaglio e causare un'alterazione dei gradienti ionici tra il citoplasma e l'ambiente extracellulare, che il microrganismo non è in grado di compensare. L'azione battericida e la lisi della cellula avviene nel giro di minuti in relazione alla concentrazione del peptide².

INTERDISCIPLINARIETÀ DELLA RICERCA SUI PFP E APPROCCIO DELLA BIOFISICA

Da quanto affermato, è evidente che la ricerca sui PFP presenta un carattere altamente interdisciplinare, per il quale risulta necessario che le competenze di esperti provenienti da campi differenti – medicina, farmacologia, biofisica, biochimica, ingegneria genetica – vengano integrate attraverso scambi intensi e progetti di ricerca comuni.

In questo lavoro viene presentato uno studio biofisico su una membrana modello contenente un PFP, nel quale sono state sondate le potenzialità di una tecnica sperimentale – la spettroscopia neutronica – e di una tecnica computazionale – la dinamica molecolare – nello studio di tali sistemi. L'approccio della fisica nello studio di questi sistemi procede per passi successivi con complessità crescente: in primo luogo si prende in esame il sistema nella sua forma più semplice, ovvero il doppio strato lipidico e, una volta in grado di fornire una descrizione completa di questo, si introducono in successione altri elementi (ad esempio proteine), realizzando e studiando in tal modo sistemi quanto più simili a quelli naturali. Ciò è possibile grazie ai doppi strati artificiali, nei quali possono essere aggiunti singolarmente altri elementi. Questo tipo di approccio consente inoltre un'analisi altamente specifica, permettendo di comprendere a quali elementi siano attribuibili i comportamenti osservati nel sistema investigato. Nel caso del sistema oggetto del presente studio è stato possibile determinare gli effetti di un PFP sulla sola componente lipidica delle membrane. È evidente che il concetto chiave nello studio dei sistemi biologici è il legame che intercorre tra struttura, dinamica e funzione.

Lo studio delle caratteristiche strutturali dei doppi strati artificiali ha permesso di rivelare la presenza di diverse fasi proprie sia delle membrane naturali che di quelle artificiali, in maniera analoga alle fasi solida, liquida, gassosa presenti nella maggior parte delle sostanze. Gli stati di aggregazione più importanti sono gli stati subgel, gel, rippled gel e fluido (o liquido cristallino), che si presentano in ordine crescente di temperatura (figura 1).

Inoltre, specifici meccanismi funzionali sono riconducibili a moti locali dei lipidi, quali la diffusione rotazionale delle molecole lipidiche intorno al loro asse molecolare maggiore, la diffusione laterale nel piano della membrana, i moti di vibrazione verticale (figura 2).

ARGOMENTO

UN MODELLO DI STUDIO: DMPC E GRAMICIDINA

La membrana modello presa in esame è costituita dal lipide DMPC (1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine, C₃₆H₇₂N₈O₈P) (figura 3). Essa è stata studiata anche in presenza di un PFP, la gramicidina D (figura 4), estratta dal batterio *Bacillus Brevis*. Nelle membrane la gramicidina forma un canale a β -elica destrogira, costituito dalla dimerizzazione di due unità di gramicidina; essa è una molecola altamente idrofobica che si inserisce favorevolmente all'interno di un doppio strato lipidico ma, allo stesso tempo, la sua struttura interna costituisce un ambiente adatto per la conduzione di cationi monovalenti (con sequenza selettiva Cs⁺>K⁺>Na⁺>Li⁺). Il gating del canale di gramicidina deriva dall'allineamento assiale dei due monomeri ad elica, meccanismo che permette inoltre che il canale attraversi la membrana; la chiusura del canale consiste invece nella separazione dei monomeri.

La gramicidina è attiva contro i batteri Gram-positivi, ad eccezione dei bacilli Gram-positivi, e contro alcuni batteri Gram-negativi, come la *Neisseria*. Il suo uso terapeutico è limitato ad applicazioni topiche dal momento che non ha specificità d'azione ed induce emolisi a concentrazioni inferiori a quelle necessarie per esplicare la sua azione antibiotica. Inoltre, la gramicidina sembra avere un'attività anti-HIV, suggerendo un potenziale uso di questo peptide per trattare infezioni sessualmente trasmissibili, quali HIV e HSV.

La gramicidina, a causa delle sue piccole dimensioni, della relativa facilità con cui si inserisce all'interno delle membrane per formare canali e della semplicità di estrazione dal *Bacillus Brevis*, rappresenta un sistema modello ideale tramite il quale studiare la permeazione attraverso le proteine di membrana, le interazioni fra proteina e membrana e gli effetti sulla dinamica dei doppi strati lipidici conseguenti all'inserimento di un polipeptide. Inoltre, la dimensione relativamente piccola del canale formato dalla gramicidina rende quest'ultima un eccellente sistema modello su cui effettuare simulazioni di dinamica molecolare.

La gramicidina permette – tra l'altro – di studiare le interazioni tra proteina e membrana.

STUDIO SU SCALA ATOMICA DELLE INTERAZIONI PEPTIDE-MEMBRANA

Spettroscopia neutronica

La spettroscopia neutronica è una tecnica sperimentale che interessa molti campi di ricerca e che si presta particolarmente allo studio di sistemi biologici. Gli esperimenti di scattering di neutroni vengono condotti in laboratori di ricerca internazionali; lo studio presentato in questo lavoro è stato effettuato presso l'Istituto Laue Langevin di Grenoble – Francia³.

L'obiettivo dello studio condotto con la spettroscopia neutronica è stato quello di investigare le dinamiche locali della membrana modello DMPC che interessano la scala temporale delle centinaia di picosecondi (10⁻¹² sec) e la scala spaziale dell'angstrom (10⁻¹⁰ m). La stessa membrana è stata studiata anche in presenza di gramicidina, al fine di valutare gli effetti di questo oligopeptide sulle dinamiche di membrana. Gli esperimenti di scattering di neutroni permettono di sondare le dinamiche macro-molecolari che sono coinvolte nell'attività biologica, perché è possibile scegliere una finestra spazio-temporale che corrisponde ai moti degli ato-

Figura 1. Fasi di un doppio strato lipidico.

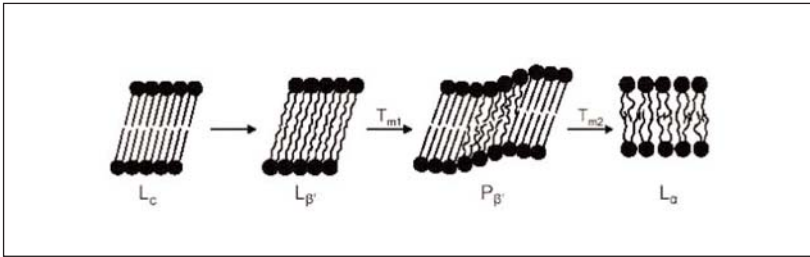


Figura 2. Moti dei lipidi di membrana.

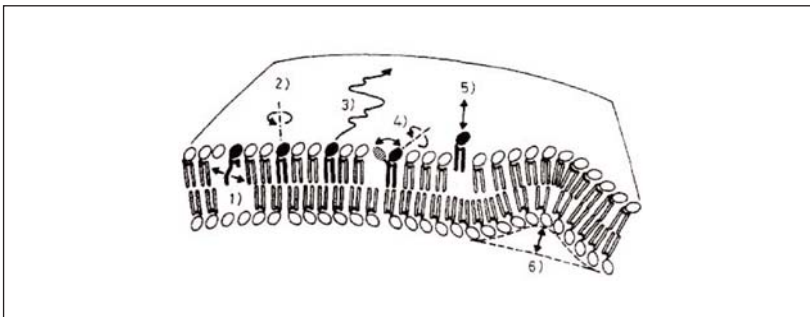


Figura 3. Struttura del lipide DMPC.

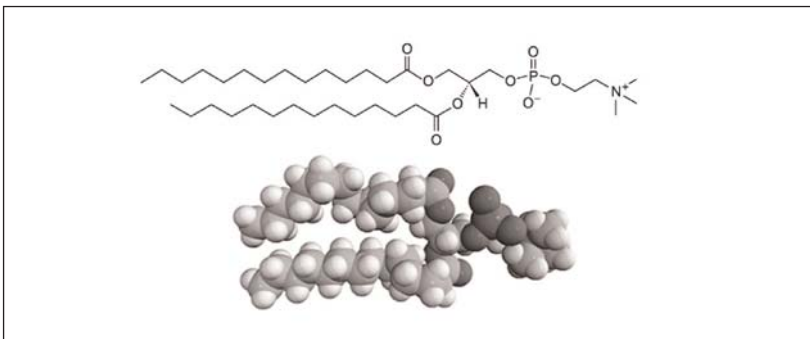
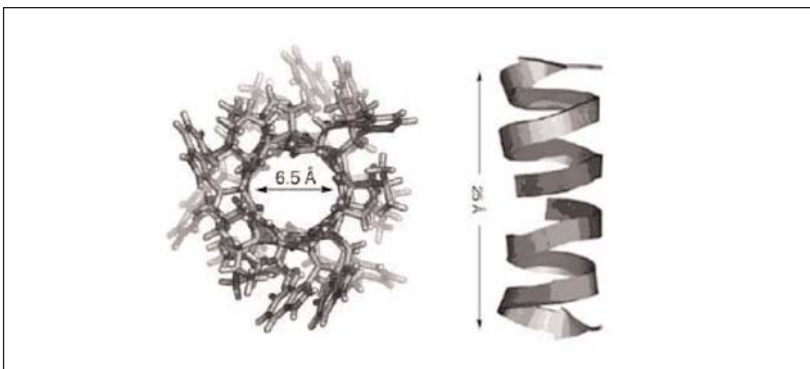


Figura 4. Struttura del canale transmembrana formato dalla gramicidina D.



ARGOMENTO

mi di idrogeno legati a gruppi molecolari di più grandi dimensioni, come nelle catene laterali degli amminoacidi o nei lipidi. Nelle misure condotte sono state investigate separatamente i movimenti dei lipidi nelle direzioni parallela e perpendicolare al piano della membrana. Da un'analisi in funzione della temperatura possono essere dedotte informazioni sull'attivarsi di mobilità molecolari e sull'incipit di transizioni strutturali o dinamiche. I campioni studiati sono multistrati lipidici idratati, costituiti dall'aggregazioni di più doppi strati, tra i quali si crea un ambiente favorevole per l'inserimento di solventi polari.

SIMULAZIONE AL COMPUTER

Poiché l'elevata complessità dei sistemi biologici limita l'informazione che è possibile estrarre direttamente tramite le indagini sperimentali, una caratterizzazione migliore della membrana DMPC è stata ottenuta conducendo una simulazione al computer su un modello dettagliato, basato su interazioni microscopiche realistiche. Le simulazioni infatti facilitano l'interpretazione dei dati sperimentali e forniscono informazioni che non sono direttamente accessibili tramite gli esperimenti. Il confronto e l'accordo tra i dati sperimentali e computazionali permettono di convalidare il modello del sistema adoperato nelle simulazioni e utilizzarlo per l'interpretazione dei dati sperimentali e per una migliore comprensione delle interazioni intermolecolari. Il metodo maggiormente usato per simulare sistemi biologici su scala atomica è la dinamica molecolare. Con la dinamica molecolare e le attuali capacità di calcolo, è possibile analizzare sistemi contenenti 10^5 atomi per tempi dell'ordine delle decine di nanosecondi⁴. In questo lavoro è stata condotta una simulazione di 5 nanosecondi su una membrana DMPC nella fase fluida, in condizioni di idratazione completa; il sistema investigato è composto da 64 molecole DMPC e 1645 mo-

Utilità delle simulazioni al computer.

La dinamica molecolare è il metodo più diffuso per simulare sistemi biologici su scala atomica.

Figura 5. Struttura della membrana ottenuta con la simulazione al computer.



lecole d'acqua, per un totale di 12487 atomi (figura 5). Il programma usato è DL POLY 2.16⁵; la simulazione è stata condotta su 8 cpu del cluster "Eneadi" del Centro di Calcolo "A. Villari" dell'Università di Messina⁶.

RISULTATI

Dalle misure di scattering di neutroni sono state dedotte informazioni sulle mobilità molecolari e su transizioni strutturali e dinamiche nella membrana DMPC, e sull'influenza della gramicidina sulle proprietà del doppio strato lipidico. In particolare sono state rivelate due transizioni che interessano le catene idrocarburiche: 1) la transizione dalla fase *rippled gel* alla fase liquido cristallina e 2) la transizione di scongelamento dell'acqua di idratazione in seguito alla quale si osserva anche una maggiore dinamica della membrana ed in particolar modo delle catene idrocarburiche. È stato osservato che l'inclusione della gramicidina:

- ▶ ostacola fortemente i moti delle molecole lipidiche;
- ▶ favorisce la fase fluida del sistema, abbassando la temperatura di transizione principale;
- ▶ causa un innalzamento della temperatura della transizione connessa all'acqua di idratazione.

Una descrizione dettagliata delle misure effettuate e una discussione più approfondita dei risultati ottenuti sono fornite in un articolo di prossima pubblicazione⁷.

Dalla simulazione di dinamica molecolare è stato determinato il profilo di densità elettronica nella direzione perpendicolare al piano della membrana, in buon accordo con i risultati ottenuti con la diffrazione di raggi X⁸. Da questo è possibile derivare parametri strutturali di interesse, come la distanza tra le teste polari. Inoltre, con la simulazione, è possibile analizzare la diffusione delle molecole lipidiche nelle direzioni parallela e perpendicolare al piano della membrana. I valori dei coefficienti di diffusione determinati con la simulazione ben si accordano con i valori sperimentali ottenuti tramite scattering di neutroni⁹. L'accordo tra dati sperimentali e computazionali è di importanza fondamentale in quanto consente di convalidare il modello di descrizione della membrana DMPC adottato nelle simulazioni.

Una descrizione più dettagliata delle interazioni tra la gramicidina ed i lipidi di membrana potrebbe essere ottenuta a) effettuando misure su campioni con differenti concentrazioni di gramicidina e gradi di idratazione; b) studiando il sistema con tecniche sperimentali complementari, quali la spettroscopia NMR e la calorimetria; c) investigando il sistema DMPC in presenza di gramicidina su scala microscopica tramite la simulazione. I punti elencati costituiscono l'obiettivo che ci si prefigge come naturale seguito ed approfondimento di questo lavoro.

CONCLUSIONI

Sono state descritte alcune delle possibili applicazioni delle proteine pore-forming in campo medico e farmacologico, sottolineando il carattere altamente interdisciplinare di questa ricerca. È stato presentato uno studio

Molto importante è l'accordo tra dati sperimentali e computazionali.

ARGOMENTO

biofisico su una membrana modello (DMPC) in presenza di un oligopeptide pore-forming, la gramicidina, volto a sondare le potenzialità di indagine su questo sistema di una tecnica sperimentale – la spettroscopia neutronica – e di una tecnica computazionale – la dinamica molecolare. In particolare, lo scattering di neutroni è una tecnica sensibile agli effetti di oligopeptidi trans-membrana sulla componente lipidica delle membrane e la simulazione di dinamica molecolare condotta ha fornito risultati in buon accordo con quelli sperimentali. **R&P**

BIBLIOGRAFIA

1. Panchal RG, Smart ML, Bowser DN, Williams DA, Petrou S. Pore-forming proteins and their application in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3: 99-115.
2. Gallo R, Huttner K. Anti-microbial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 739-43, 10.1046/j.1523-1747.1998.00361.x
3. Istituto Laue Langevin, Grenoble, Francia, www.ill.fr
4. Kandt C, Ash W L, Tieleman DP. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* 2007; 41: 475-88.
5. Smith W. CCP5: a collaborative computational project for the computer simulation of condensed phases. *J Mol Graphics* 1987; 5: 71-4.
6. Centro di calcolo elettronico "Attilio Villari", <https://cronos.unime.it>
7. Wanderlingh UN, et al. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2008 (in pubblicazione).
8. Petrache HI, Tristram-Nagle S, Nagle JF. Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chem Phys Lipids* 1998; 95: 83-94.
9. Pfeiffer W, Henkel Th, Sackmann E, Knoll W, Richter D. Local dynamics of lipid bilayers studied by incoherent quasi-elastic neutron scattering. *Europhys Lett* 1989; 8: 201-6.