

## Interação do Peptídeo TgPEP16 RRVYKKLFLV-NH<sub>2</sub> com Membranas Modelo

Jessica Sayuri Goya Higa

Gustavo Penteado Battesini Carretero

Hernan Chaimovich

Iolanda Midea Cuccovia

Instituto de Química/Universidade de São Paulo

[jessi.sayuri@usp.br](mailto:jessi.sayuri@usp.br), [gustavo.carretero@usp.br](mailto:gustavo.carretero@usp.br), [hchaimo@usp.br](mailto:hchaimo@usp.br); [imcuccov@iq.usp.br](mailto:imcuccov@iq.usp.br)

### Objetivos

Estudar a atividade biológica e as propriedades da interação do peptídeo TgPEP16, (sequência: RRVYKKLFLV-NH<sub>2</sub>), presente em proteínas do cacau (*Theobroma cacao*) e algodão (*Gossypium hirsutum*), com membranas modelo (micelas e vesículas) para elucidação do seu mecanismo de ação. Assim, vamos obter informações que permitam programar a sequência de aminoácidos que levem a peptídeos com maior atividade antimicrobiana e com baixa toxicidade para células humanas. Os resultados serão comparados com os obtidos com o peptídeo BP100 (KKLFFKILKYL-NH<sub>2</sub>) para verificar a relevância das alterações de aminoácidos da sequência do TgPEP16 na interação com modelos de membrana e se este peptídeo tem ação antimicrobiana similar ao BP100. A estrutura secundária do peptídeo será estudada por modelagem molecular *in silico* e através de técnicas espectroscópicas. A atividade do peptídeo será estudada medindo-se o vazamento de carboxifluoresceína, CF.

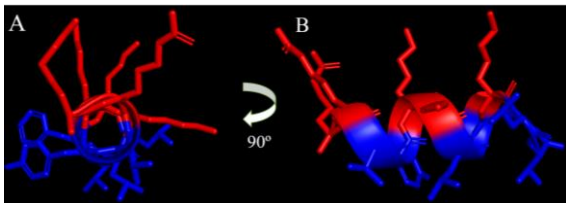
### Métodos e Procedimentos

Ambas as predição e modelagem estruturais foram realizadas a partir da sequência de aminoácidos do TgPEP16 utilizando o software PEPFOLD que gera os cinco melhores modelos estruturais para o peptídeo e o perfil de previsão de estrutura local. O programa

HeliQuest permitiu calcular as propriedades físico-químicas (hidrofobicidade, momento hidrofóbico e carga líquida) do peptídeo a partir da sequência de aminoácidos e, assumindo-se que o peptídeo está em hélice, é possível analisar os resíduos polares e não polares, assim como obter a projeção helicoidal. Micelas foram preparadas com misturas de 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina (LPC), e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (LPG), e as vesículas com misturas dos lipídios (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (POPG). As vesículas multilamelares (MLVs) e unilamelares (LUVs) foram preparadas a partir de filmes dos lipídios formados misturando-se soluções dos lipídios em clorofórmio nas proporções desejadas e evaporando o solvente com um fluxo de N<sub>2</sub>. Os filmes foram res-suspendidos no tampão adequado e o tubo foi vortexado formando as MLVs que foram extrusadas por uma membrana de policarbonato com poro de 100 nm de diâmetro obtendo-se as LUVs. A estrutura secundária do peptídeo foi determinada por CD em um espectro-polarímetro Jasco J-720. A afinidade do peptídeo pelas vesículas e micelas foi determinada pela fluorescência da tirosina em um espectrofluorímetro RF-5031-PC. A atividade de TGPep16 foi determinada medindo-se o vazamento de LUVs contendo CF. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada para *E. coli* e *S. aureus*.

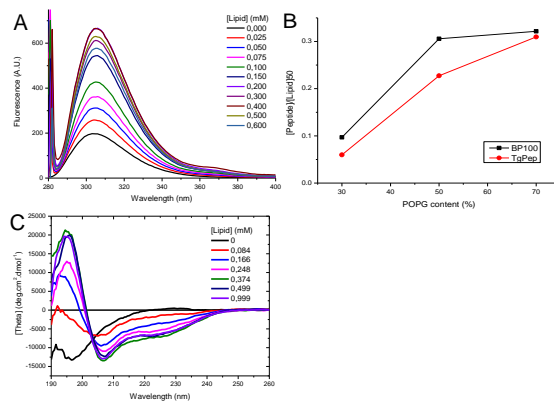
## Resultados

O software PEPFOLD forneceu o perfil de previsão de estrutura local do TgPEP16 em que os resíduos estão predominantemente em estrutura helicoidal. Há também pouca probabilidade de o peptídeo estar em uma estrutura randômica e pouquíssima probabilidade na estrutura estendida. A estrutura 3D obtida com PEPFOLD mostra o peptídeo na conformação helicoidal (Fig. 1). É clara a forma em que resíduos de caráter hidrofóbico (azul) e hidrofílico (vermelho) se separam entre as duas faces da hélice. A hélice anfipática formada é compatível com o ambiente de interface da bicamada lipídica, especialmente as ricas em lipídios negativos (POPG).



**Fig 1.** Estrutura do peptídeo TgPEP16.

Estudos de fluorescência e de CD mostraram que TgPEP16 liga-se às micelas e bicamadas lipídicas de forma dependente do conteúdo de lipídio com carga negativa, LPG ou POPG (**Fig 2. A, B e C**). A análise da estrutura secundária do peptídeo por CD confirmou que, quando ligado em membranas modelo, TgPEP16 adquire estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice (**Fig 2.C**). Assim como BP100, em solução, o peptídeo tem uma estrutura flexível/randômica. Tanto em micelas como em bicamadas, o peptídeo adotou a estrutura em hélice, indicando que a conformação da forma ligada independe do tipo de agregado anfifílico. O TgPEP16, além de ligar-se, foi capaz de permeabilizar membranas lipídicas causando o vazamento da sonda fluorescente CF. De acordo com o observado nos estudos de ligação, o peptídeo apresentou maior atividade de permeabilização em LUVs contendo o POPG. O TgPEP16 inibiu o crescimento bacteriano, e as MICs para *E. coli* e *S. aureus* foram de 32 e 2  $\mu$ M, respectivamente e, para BP100, as MIC foram 2 e 1  $\mu$ M.



**Fig 2.** (A) Espectros de fluorescência da tirosina de TGPEP16 em tampão Tris HCl pH 7,4 e LUVs de POPC:POPG (50:50). (B) Razão P/L na qual 50% do TGPEP16 está ligado às LUVs em função da %POPG. (C) Espectros de CD do TGPEP16 em solução e em diferentes concentrações de micelas de LPC:LPG (70:30).

## Conclusões

Os softwares forneceram informações importantes sobre a estrutura helicoidal e característica anfipática do TgPEP16. Utilizando o CD observou-se mudança da estrutura randômica para alfa helicoidal do peptídeo, concordando com o resultado obtido pelos softwares de previsão. Com os experimentos de fluorescência, observou-se que em micelas e bicamadas houve divergência no comportamento da afinidade entre lipídio-peptídeo. Em bicamadas observou-se que não houve ligação entre o peptídeo e LUVs compostas apenas por lipídeos neutros (POPC), apontando a importância do efeito eletrostático para a interação. Em micelas houve ligação dos peptídeos com o lisofosfolípido sem carga (LPC), mostrando a importância do grau de empacotamento e hidratação dos sistemas lipídicos estudados.

**Suporte:** CNPq: J.S.G.H. 138923/2020-5 I.M.C. 465259/2014-6 e H.C. (301907/2019-6), FAPESP: I.M.C. 2013/08166-5 e G.P.B.C. 2018/15230-5, INCT-FCx e NAP-FCx.

## Referências Bibliográficas

- Manzini et al., 2014. BBA Biomembranes 1838, 1985–1999.  
Carretero et al., 2018. BBA Biomembranes 1860, 1502–1516.  
Carretero et al., 2021. Biomolecules 11, 542.