

Estudo da influência do tampão fosfato na interação do peptídeo antimicrobiano homotarsinina com membranas fosfolipídicas

Rodrigo Moreira Verly¹(PG)*, Jarbas Magalhães Resende¹(PQ), Marcelo P. Bemquerer²(PQ), Dorila Piló-Veloso¹(PQ). rodrigoverly@oi.com.br

1- Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, P.O. Box 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

2- Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pq. Estação Biológica, Final W5 Norte, P.O. Box 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

Peptídeo antimicrobiano, lipossomas, bicelas, RMN, ITC, DLS.

Introdução

Anuros são fontes valiosas de peptídeos com diferentes atividades biológicas. Algumas destas substâncias exercem suas atividades por permeabilização da membrana bacteriana cujo mecanismo, apesar de investigações intensas, ainda é desconhecido, embora alguns modelos estejam propostos no literatura¹. Com o objetivo de se obter maiores informações sobre o mecanismo de ação do peptídeo dimérico e antimicrobiano homotarsinina (HMT, **1**), isolado da pele do sapo *Phyllomedusa tarsius*², neste trabalho é apresentado um estudo do efeito do tampão fosfato na interação dessa substância com membranas fosfolipídicas. A sequência primária de HMT é apresentada a seguir:



Resultados e Discussão

A síntese de HMT foi realizada pela estratégia Fmoc em fase sólida, seguida pela dimerização via formação da ligação de dissulfeto intercadeias entre resíduos de cisteína. O peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta resolução (RP-HPLC) e caracterizado por espectrometria de massas (ESI-MS). O efeito do tampão fosfato na interação do peptídeo com vesículas unilamelares (LUVs) de fosfatidilcolina (PC) foi investigado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e espalhamento de luz dinâmica (DLS). O mesmo efeito foi estudado por RMN na interação de HMT com bicelas a base de PC. Para PC-LUVs (Fig. 1a), os estudos por ITC mostram um alto valor da constante de ligação ($K=2500$), e fatores entálpico e entrópico ($\Delta H= -580$ Kcal/mol e $\Delta S= -5470$ Kcal/mol) que favorecem a ligação de HMT com as bicamadas de PC-LUVs. Esta interação ocorre de forma eletrostática (ΔH exotérmico) com incorporação parcial de HMT na bicamada de LUVs, como mostrado pelo aumento do tamanho de vesícula observado por DLS (Fig. 1c). Os resultados da interação de HMT e LUVs-tampão (Fig. 1b) mostram uma menor interação do peptídeo com a bicamada, com K da ordem de

cinco vezes menor ($K=540$). Esta menor interação reflete um menor aumento no tamanho das LUVs com a adição do tampão fosfato (Fig. 1c).

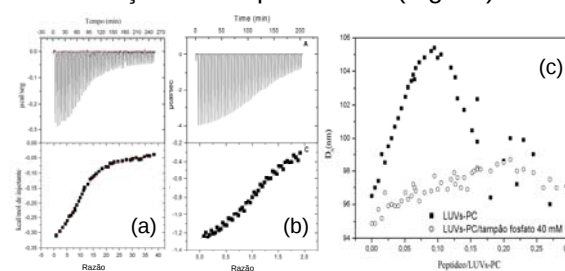


Figura 1. a) ITC de HMT/PC-LUVs. b) ITC HMT/LUVs-tampão. c) raio hidrodinâmico de LUVs x HMT/PC-LUVs.

Os dados de RMN mostram que a adição de 100 μM de HMT causa uma desordem na orientação das moléculas de H_2O devido à forte interação peptídeo-bicela (Fig 2a,b). A adição de fosfato resulta em uma melhor orientação das bicelas (Fig 2c). O fosfato compete com o fosfolípídeo na interação com HMT, liberando-o da superfície da bicela, reorientando as moléculas de água devido à reorganização das estruturas das bicelas.

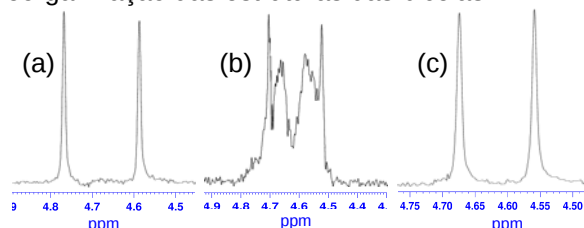


Figura 2. Espectro 1D de ^2H em bicelas de didodecil-PC (12-PC) e dihexil-PC (6-PC). a) Somente bicelas. b) Bicelas/HMT. c) Bicelas/HMT/tampão fosfato 40 mM.

Conclusões

Este estudo mostra que o tampão fosfato afeta significativamente a interação dos sítios catiônicos do peptídeo com a superfície da membrana.

Agradecimentos

CNPQ, FAPEMIG.

1. Seelig J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**; 1666:40-50.

2. Batista C. V. F., et. al.; *FEBS Lett.*, **2001**, 494, 85-89.