



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijски odsjek

Lea Pašalić

# **KALORIMETRIJSKI PRISTUP PEPTID-LIPID INTERAKCIJAMA**

**Kemijски seminar 1**

Jobin M.L, Alves I, *Microcalorimetry of biological molecules* (2019) 3.-15.

Zagreb, 2022.

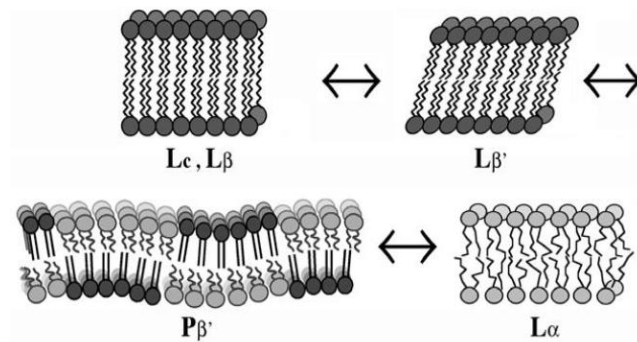
## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Interakcija peptida s membranom.....	2
2.1. Eksperimentalne i teorijske metode proučavanja peptid-lipid interakcija..	3
3. Razlikovna pretražna kalorimetrija.....	4
3.1. Informacije dobivene DSC analizom.....	6
3.2. Formiranje lipidnih domena i raspodjela peptida u različite domene.....	7
4. Izotermalna titracijska kalorimetrija .....	8
4.1. Informacije dobivene izotermalnom titracijskom kalorimetrijom.....	9
5. Zaključak.....	10
6. Literatura:.....	11

# 1. Uvod

U membranski aktivni peptide ubrajamo razne molekule kao što su antimikrobni peptidi, peptidi koji prodiru u stanicu, te virusni i amiloidni peptidi koji su uključeni u razna patološka stanja. Membranski aktivni peptidi predstavljaju važne mete zato što su ili temelj novih terapija ili uzrokuju određena patološka stanja (virusni i amiloidni peptidi). Svi dijele zajedničko svojstvo interakcije sa staničnom lipidnom membranom u svom načinu djelovanja. Zbog toga je bolje razumijevanje peptid-lipid interakcija važno za shvaćanje mehanizma djelovanja.<sup>1</sup> Između ostalih biofizikalnih tehnika koje se koriste za karakteriziranje peptid-lipid interakcija, razlikovna pretražna kalorimetrija i izotermalna titracijska kalorimetrija omogućavaju određivanje utjecaja peptida na fazni prijelaz lipida, svojstvo koje odražava način peptid-lipid interakcije.

Svojstva membrane lipida mijenjaju se s promjenom temperature. Lipidne membrane podliježu prijelaznim stanjima kako temperatura raste, a temperatura pri kojoj se to događa naziva se temperatura fazne promjene. Fazni prijelazi lipida u potpunosti su reverzibilni.<sup>2</sup> Lamelarno usmjereni lipidi pri niskim temperaturama nalaze se u tako zvanoj gel fazi ( $L_{\beta}$ ), pri čemu je lipidni dvosloj uređena, čvrsta struktura. Pretranzicija je često vidljiva samo za jednokomponentne lipidne vezikule i uobičajeno nije prisutna u smjesi lipida. Porastom temperature dolazi do nastajanja  $P_{\beta}$  faze, u kojoj se na površini dvosloja stvaraju nabori (engl. *ripples*). U ovoj, prijelaznoj fazi, dvosloj je još uvijek uređen ali sa niskim stupnjem fluidnosti. Temperatura pri kojoj se događa prijelaz iz  $L_{\beta}$  u  $P_{\beta}$  fazu naziva se preprijelazna temperatura (eng. *pre-transition temperature*). Pri višim temperaturama, lipidi podliježu glavnom faznom prijelazu u fluidnu fazu ( $L_{\alpha}$ ), koja je popraćena gubitkom uređenosti strukture, smanjenjem debljine dvosloja i bočnom ekspanzijom.<sup>3</sup> Temperatura pri kojoj se faza mijenja iz gela ( $L_{\beta}$ ) u fluid ( $L_{\alpha}$ ) je temperatura mekšanja  $T_m$ . Glavni prijelaz događa se pri višim temperaturama, brži je i povezuje se s većom vrijednosti entalpije u odnosu na pretranziciju. Svojstva faznog prijelaza lipida ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su duljina lanca masnih kiselina, stupanj nezasićenosti, priroda i veličina polarne glave lipida, svojstva pufera (ionska jakost, vrsta iona, pH) kao i vanjski faktor, tlak.<sup>4</sup>



Slika 1. Fazni prijelazi membranskog dvosloja uslijed povišenja temperature <sup>2</sup>

Jedan od biofizikalnih pristupa koji omogućuje potpunu karakterizaciju faznog prijelaza lipida je razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC). Pomoću DSC tehnike možemo mjeriti temperature faznih prijelaza ( $T_{pre}$ ,  $T_m$ ,  $T_H$ ) kao i entalpiju ( $\Delta H$ ) i kooperativnost faznih prijelaza. Način interakcije peptida s lipidima može se precizno proučavati koristeći DSC tehniku. Interakcijom peptida i lipida, peptidi mogu uzrokovati promjenu u lipidnim svojstvima kao što je pakiranje lipida, fluidnost membrane, kooperativnost tranzicije i ostalo što se odražava drugačijim parametrima mjerenim DSC tehnikom.<sup>1</sup> Osim razlikovno pretražne kalorimetrije, druga kalorimetrijska tehnika koja se koristi za proučavanje peptid-lipid interakcija je izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC), visoko osjetljiva tehnika za proučavanje molekulskih interakcija.<sup>5</sup>

## 2. Interakcija peptida s membranom

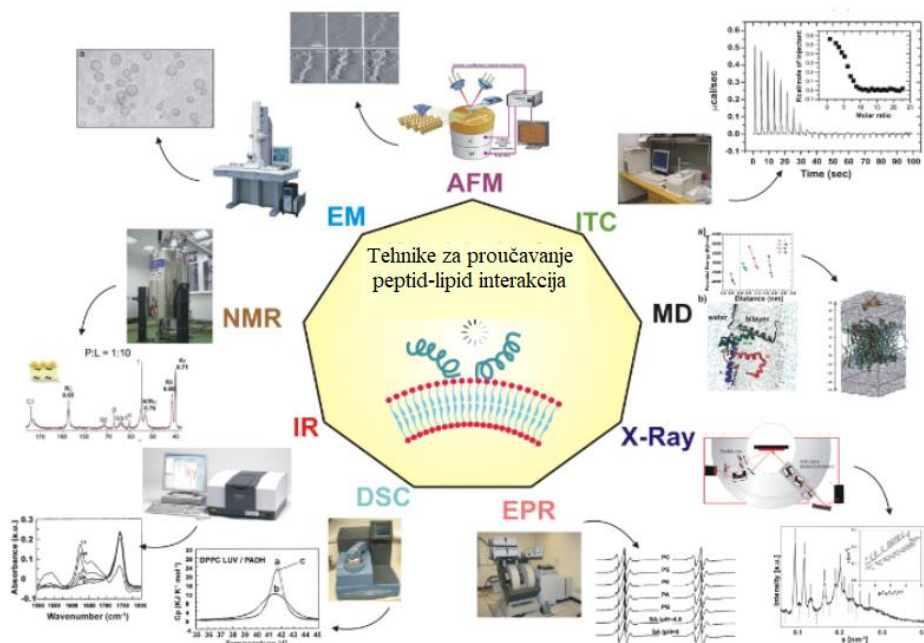
Interakcije peptida s membranom uključene su u brojne važne biološke procese, kao što su antimikrobni obrambeni mehanizam, translokacija virusa, fuzija membrane, funkcije membranskih proteina, prijenos terapeutskih spojeva i drugo. Peptidi koji djeluju na membranu obuhvaćaju veliku obitelj različitih peptida koji pokazuju širok niz bioloških aktivnosti i zbog toga privlače veliki interes za njihovu biomedicinsku primjenu. Tijekom interakcije peptida s membranom, oboje, peptidi i membrana mogu proći niz strukturalnih promjena.<sup>6</sup>

Dakle, teorijska i eksperimentalna istraživanja interakcija peptida s membranom izazovna su tema istraživanja te kompletno razumijevanje veze između strukture peptida i mehanizma interakcije s lipidima, kao i detaljni molekularni procesi i dalje su nedovoljno istraženi. Antimikrobni peptidi (AMP) imaju sposobnost prepoznavanja i ubijanja mnogih patogena te su brojni od njih identificirani kao ključne komponente prirodnog imunološkog obrambenog

sustava. Srodna obitelj peptida, peptidi koji prodiru u stanicu, sposobni su za učinkovitu translokaciju kroz staničnu membranu, samostalno ili zajedno s molekularnim teretom te se istražuju kao potencijalni programirani vektori za prijenos lijekova.<sup>7</sup> Ne postoji jasna razlika između AMP-ova i CPP-ova zapravo, neki AMP-ovi su sposobni prijeći membranske dvoslojeve, a neki CPP-i pokazuju antimikrobno djelovanje, stoga se trag o njihovim različitim aktivnostima izvodi iz njihove interakcije s lipidnim dvoslojem.<sup>6</sup> Drugi membranski aktivni peptidi igraju važnu ulogu u staničnim procesima, kao što je fuzija membrane, svepristuni proces koji predstavlja ključnu fazu u „prometu“ proteina, egzocitozi i endocitozi, ulasku i izlasku virusa.<sup>8,9</sup> Lipidni dvosloj meta je brojnih navedenih peptida ali neki peptidi kao što su peptidni hormoni i bakterijski toksini vjerojatno djeluju na proteine smještene u membranama. Među peptidima koji djeluju na mebranu, oni koji uzrokuje promjene su fundamentalni jer se mogu iskoristiti za dobivanje potencijalnih novih antibiotika.<sup>6</sup>

## 2.1. Eksperimentalne i teorijske metode proučavanja peptid-lipid interakcija

Vežanje, mjesto i orijentacija peptida u odnosu na lipidni dvosloj kao i preraspodjela lipida u prisutnosti peptida najvažnije su značajke peptid-lipid interakcija. Tijekom posljednjih desetljeća, razvijeno je nekoliko eksperimentalnih tehnika koje su primjenjivane na biološke sustave, koji se razlikuju po prirodi i veličini uzorka, osjetljivosti, vrsti i rezoluciji informacija koje mogu pružiti. Postoje tehnike koje opisuju morfološke promjene izazvane peptidima kao što su elektronska mikroskopija (EM) i mikroskopija atomskih sila.<sup>10</sup> Postoje i druge tehnike kao što je kalorimetrija, koja omogućuje identifikaciju promjena u termodinamička svojstva membrane, nuklearna magnetska rezonancija u čvrstom stanju (NMR) i rendgensko zračenje (X-zrake), koje opisuju generalne promjene faza.<sup>11</sup> Tehnike kao što su fluorescencija, elektronska paramagnetska rezonancije (EPR), infracrvena spektroskopija (IR), cirkularni dikroizam (CD), površinska plazmonska rezonancija (SPR), X-zrake i NMR ilustriraju interakciju i sposobni su opisati strukturu i dinamiku peptida i lipida. Računalne studije imaju široku primjenu za proučavanje interakcija peptida s lipidima i esencijalne su za istraživanje dinamičkih procesa u biologiji i kemiji, pružajući podatke u veličinama i vremenskim skalama koje nisu dostupne eksperimentalnim tehnikama.<sup>10</sup> U ovom radu pružit ćemo detaljan kalorimetrijski pristup peptid-lipid interakcijama.

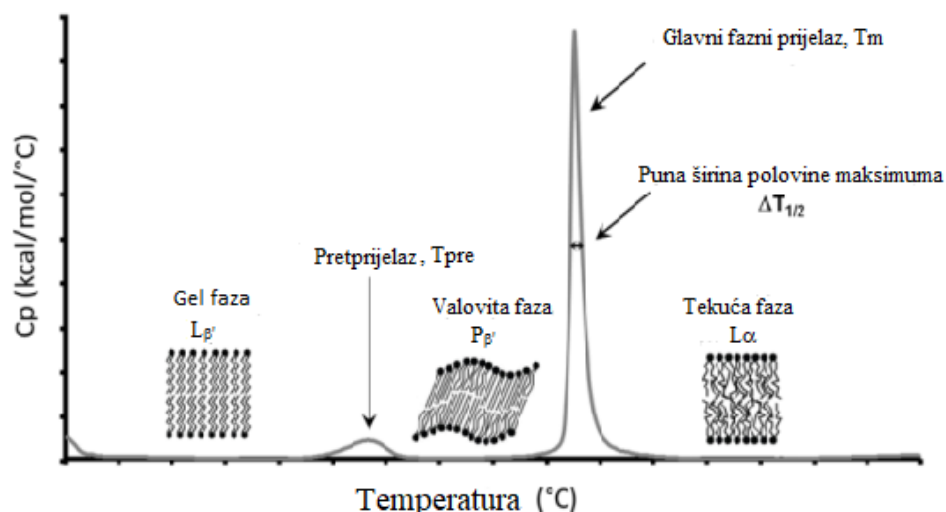


Slika 2. Shematski prikaz tehnika za proučavanje peptid-lipid interakcija <sup>6</sup>

### 3. Razlikovna pretražna kalorimetrija

Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) je jednostavna ali snažna neperturbirajuća fizikalna tehnika, prikladna za termodinamičku karakterizaciju termotropnog faznog prijelaza u modelnim lipidnim i biološkim membranama.<sup>1</sup> Kalorimetar se sastoji od dvije ćelije, referentne ćelije te ćelije sa uzorkom. Tehnika uključuje simultano grijanje ili hlađenje ćelija. Na temperaturama koje su daleko od termotropnih promjena, temperatura referentne ćelije i ćelije sa uzorkom mijenja se linearno s vremenom, a temperaturna razlika između njih ostaje konstantna. U takvim uvjetima, instrument bilježi stalnu razliku između brzine protoka topline u uzorku i referentne ćelije, što se idealno odražava ravnom, horizontalnom baznom linijom. Kad se u uzorku dogodi termotropna promjena, dolazi do temperaturne razlike između uzorka i referentne vrijednosti (pufera), instrument aktivno mijenja ulaznu snagu ćelije sa uzorkom kako bi poništio temperaturnu razliku ili pasivno zabilježava promjenu brzine protoka topline u ćeliji sa uzorkom dok se temperaturna razlika na kraju ne rasprši. U oba slučaja mijenjaju se diferencijalne brzine protoka topline u ćeliji sa uzorkom i u referentnoj ćeliji i dolazi do

egzotermnog ili endotermnog odstupanja od bazne linije. DSC može precizno izmjeriti temperaturu faznog prijelaza ( $T_{pre}$ ,  $T_m$ ,  $T_h$ ), entalpiju i kooperativnost faznog prijelaza lipida, kao i njihovu kinetiku u određenim uvjetima pomoću mjerenja razlike temperature potrebne za kompenzaciju između termodinamičkih ponašanja dvije ćelije: referentne ćelije u kojoj se nalazi pufer i ćelije u kojoj se nalazi uzorak za analizu. U DSC mjerenjima, razlika u količini topline potrebna za povećanje temperature ćelije sa uzorkom i referentne mjeri se kao funkcija temperature. Iz DSC termograma mogu se izvući tri parametra od interesa, područje ispod pika prijelaza, koje je proporcionalno entalpiji prijelaza i direktno korelira snazi van der Wallsovih sila između masnih lanaca lipid, zatim puna širina polovine maksimuma signala, koja odražava kooperativnost tranzicije povezane s brojem molekula koje istovremeno podliježu prijelazu te temperature prijelaza ( $T_{pre}$ ,  $T_m$ ,  $T_H$ ).<sup>12</sup> Interakcije između peptida i lipida mogu se precizno proučavati koristeći DSC tehniku budući da je metoda neintruzivna i ne zahtjeva korištenje proba. Interakcijom peptida i lipida, peptidi mogu uzrokovati promjenu u lipidnim svojstvima kao što je pakiranje lipida, fluidnost membrane, kooperativnost tranzicije i ostalo što se odražava drugačijim parametrima mjerenim DSC tehnikom.<sup>1</sup>



Slika 3. Termogram faznog prijelaza tri uobičajene faze lipida i odgovarajuće temperature prijelaza <sup>1</sup>

### 3.1. Informacije dobivene DSC analizom

#### 1. Modifikacija temperature faznog prijelaza

Takva promjena ukazuje na činjenicu da peptidi mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva lipida koji su odgovorni za takav prijelaz. Na primjer, ukoliko peptid smanjuje  $T_m$  prijelaza iz gela u tekuću fazu, to znači da peptid pogoduje prijelazu i ima fluidizirajući utjecaj na membranu.<sup>1</sup>

#### 2. Promjene u površini prijelaznog signala

Budući da je površina signala faznog prijelaza u izravnoj korelaciji s entalpijom prijelaza, smanjenje površine ukazuje na to da peptidi remete fazni prijelaz i smanjuju entalpiju. Za prijelaz iz gela u tekuću fazu ukazuje da peptid remeti slaganje lanaca masnih kiselina i smanjuje van der Waalsove interakcije zbog interkalacije između lanaca masnih kiselina.<sup>1</sup>

#### 3. Promjena u prijelaznom signalu pune širine na polovini maksimuma

Ovaj parametar mjeri je kooperativnosti prijelaza, što je prijelaz oštriji, veća je kooperativnost. Povećanje ovog parametra ukazuje na interkalaciju peptida između lanaca masnih kiselina.<sup>1</sup>

#### 4. Promjene u obliku prijelaznog signala

Osim što odražava promjene u kooperativnosti tranzicije, ovaj parametar povezan je s homogenošću. Pojava novog signala ukazuje na heterogenost. Ako se peptid ne raspoređuje homogeno među svim lipidima, pojava dva signala odgovara lipidnim domenama siromašnim peptidima i lipidnim domenama bogatim peptidima. Uobičajeno, oštriji signal prijelaza povezuje se s lipidnim domenama koje su siromašne peptidima a prošireni signal prijelaza povezan je s lipidnim domenama bogatim peptidima.<sup>1</sup>

Pojava novih signala prijelaza može biti zbog pojave novih lipidnih supramolekularnih struktura izazvanih peptidima.

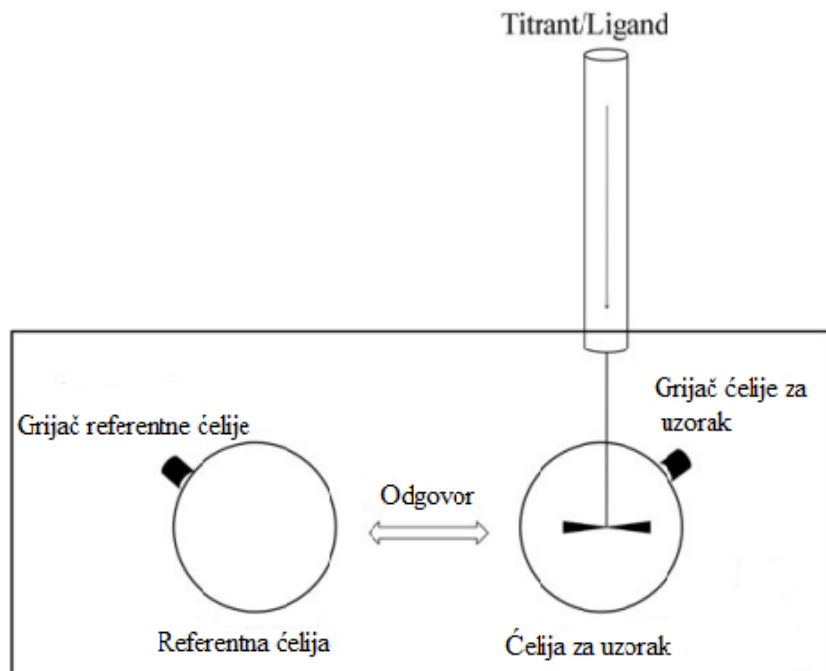


### 3.2. Formiranje lipidnih domena i raspodjela peptida u različite domene

Kada govorimo u kontekstu binarnih lipidnih smjesa, DSC se koristi za praćenje stvaranja domena u lipidnim membranama.<sup>1</sup> Dobro je poznato da stanične lipidne membrane nisu lateralno homogene i da mogu postojati u morfološki različitim strukturama ili se razlikuju samo u fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su svojstva uređenja membrane i fluidnost, što je slučaj u čvrstoj uređenoj fazi i neuređenoj tekućoj fazi. DSC se koristi za proučavanje stvaranja domena, uglavnom kroz fazne dijagrame i interpretaciju u kontekstu mješljivosti faza. S obzirom na mješljivost faza, DSC je koristan za promatranje smjese lipida, koji se mogu ili ne mogu miješati. U prvom slučaju, lipida koji se miješaju, mogu rezultirati jednim faznim prijelazom lipida (koji može biti proširen) kada lipidi imaju bliske vrijednosti  $T_m$ -a. Na primjer, kada se miješaju lipidi različitih duljina masnih lanaca, lipidi čiji se lanci razlikuju s manje od četiri ugljika ne miješaju se i rezultiraju odvojenim faznim prijelazima (dva signala).<sup>13</sup> Lipidi koji se mogu miješati, kao i oni koji se ne mogu miješati zanimljivi su za proučavanje mehanizma djelovanja membranski aktivnih peptida: 1.) U slučaju lipida koji se miješaju, DSC se može koristiti za praćenje utjecaja peptida na reorganizaciju lipida; 2.) Lipidi koji se ne miješaju rezultiraju razdvojenim faznim prijelazima uočenim DSC tehnikom, preferencijalna interakcija peptida s jednim od dva lipida može biti uočena promjenama izazvanim u svakom prijelazu nakon dodatka peptida. Osim toga, neki peptidi imaju sposobnost poboljšanja miješanja lipida.<sup>14</sup>

## 4. Izotermalna titracijska kalorimetrija

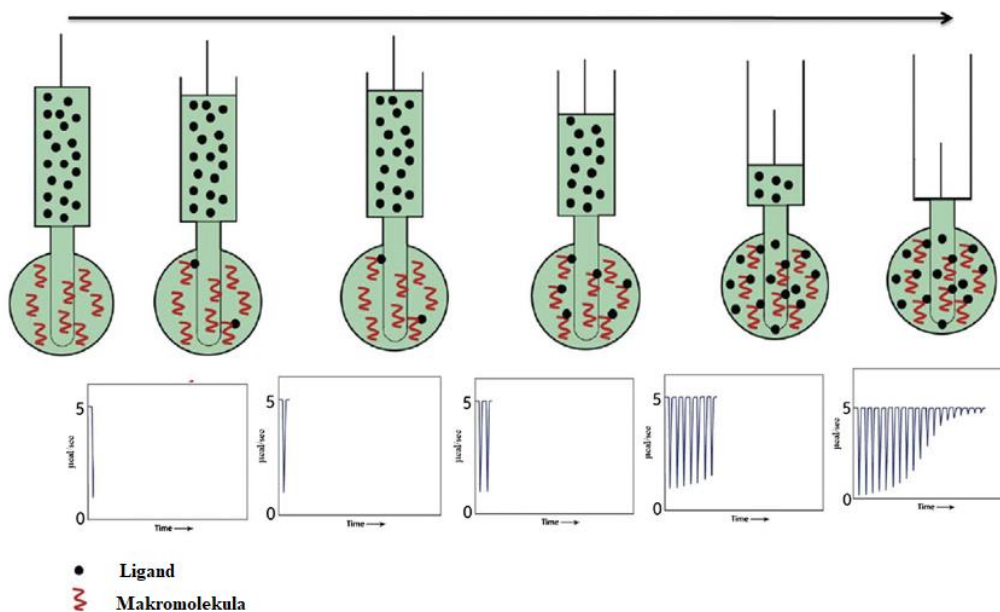
Izotermalna titracijska kalorimetrija je visoko osjetljiva fizikalna tehnika koja se koristi za određivanje termodinamičkih parametara povezanih sa biomolekularnim interakcijama u tekućoj fazi. ITC instrument sastoji se od dvije ćelije, referentne ćelije i ćelije za uzorak. Referentna ćelija puni se vodom/puferom, a ćelija sa uzorkom se puni biomolekulom od interesa koji se nalazi u odgovarajućem puferu/ otapalu. Uzorak se titrira dodavanjem liganda/titranta kroz injektor. ITC odgovor ovisi o temperaturnoj razlici između referentne ćelije i ćelije sa uzorkom. Mjera topline dobivena iz okoline (endotermni proces) ili toplina oslobođena u okolinu (egzotermni proces) može biti povezana s količinom reakcije koja se dogodila. Izlazni signal ITC eksperimenta uvijek je diferencijalna snaga. Temperaturna razlika između dvije ćelije konstanto je praćena termogrijačem a grijači smješteni na obje ćelije aktiviraju se kad je potrebno održavati istu temperaturu obje ćelije. Kada se reakcija ne događa, izlazni signal jednak je baznoj liniji. Kada se reakcija događa, temperatura ćelije u kojoj se nalazi uzorak će se mijenjati ovisno o tome oslobađa li se ili prima toplina, odnosno jel reakcija egzotermna ili endotermna. Svaka reakcija ili fizikalna promjena koja je popraćena promjenom entalpije može se mjeriti izotermalnom titracijskom kalorimetrijom.<sup>5</sup>



Slika 4. Shematski prikaz ITC-a<sup>5</sup>

## 4.1. Informacije dobivene izotermalnom titracijskom kalorimetrijom

Vežanje liganda na makromolekulu rezultiraće otpuštanjem ili potrošnjom topline, što uzrokuje promjenu temperature glavne ćelije. Međutim, instrument će uvijek održavati stalnu temperaturu u glavnoj ćeliji ekvivalentnu onoj u referentnoj ćeliji. Za održavanje temperature, instrument daje relevantnu snagu (višu ili nižu), ovisno o interakciji. Promjena topline se tada jednostavno izračunava integracijom snage po vremenu, što nam daje entalpiju reakcije. Toplina koje se otpušta ili troši tijekom kalorimetrijske reakcije odgovara frakciji vezanog liganda i povećana koncentracija liganda vodi do zasićenja supstrata i konačno se manje topline otpušta ili troši.<sup>15</sup> Precizno mjerenje otpuštene ili absorbirane topline koristi se za određivanje konstante vežanja ( $K_a$ ), entalpije ( $\Delta H$ ), entropije ( $\Delta S$ ) i stehiometrije reakcije ( $n$ ), time se svi termodinamički parametri molekularnog vežanja mogu dobiti individualnom analizom primjenjujući ovu tehniku.<sup>5</sup>



Slika 5. Slikovni prikaz ITC eksperimenta po koracima <sup>15</sup>

## 5. Zaključak

Točan način na koji peptidi reagiraju s membranama i molekularni detalji tog procesa su i dalje predmet aktivog istraživanja, opsežnih rasprava i kontroverzi. Različiti peptidi koriste različite mehanizme interakcije. Mehanizam interakcije može se mijenjati ovisno o uvjetima u sustavu, kao što su pH, temperatura i koncentracija peptida.

Kako bi se razumjeli biološki procesi interakcije peptid-membrana ili kako bi se dizajnirali peptidi s prilagođenim funkcionalnostima za specifičnu primjenu, mora se uspostaviti poveznica između strukture i fizikalnih svojstava peptida i mehanizma reakcije koji inducira.

Jasno je da bolje razumijevanje interakcije peptida s membranom na molekularnoj razini je važno ne samo za razjašnjavanje brojnih bioloških procesa nego može biti od iznimne važnosti u dizajniranju peptida sa određenim funkcionalnostima, na primjer za primjenu prijenosa antibiotika i lijekova

## 6. Literatura:

- [1] Jobin M.L, Alves I, *Microcalorimetry of biological molecules* (2019) 3.-15.
- [2] Heimburg T., *Thermal Biophysics of Membranes* (2007) 1–41.
- [3] Cullis P.R. FDB, Hope M.J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (1996) 1-32.
- [4] Lee AG *Biochim Biophys Acta* **472** (1977) 237-281.
- [5] Swamy MJ, Sankhala RS, Singh BP. *Methods Mol Biol.* (2019) 71-89.
- [6] Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Vitiello M, Morelli G, Galdiero M. *International Journal of Molecular Sciences.* **14(9)** (2013) 18758-18789
- [7] Galdiero, S., Vitiello, M., Falanga, A., Cantisani, M., Incoronato, N., Galdiero, M. *Curr. Drug Metab.* **13** (2012) 93–104
- [8] Galdiero, S. Editorial *Protein Pept. Lett.* **16** (2009) 711-715
- [9] Falanga, A., Cantisani, M., Pedone, C., Galdiero, S. *Protein Pept. Lett.* **16** (2009) 751–759.
- [10] Oreopoulos, J., Epanand, R.F., Epanand, R.M., Yip, C.M. *Biophys. J.* **98** (2010) 815–823.
- [11] Lohner, K., Prenner, E.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1462** (1999) 141–156.
- [12] Lewis Rutheven N.A.H., Mannock D.A., McElhaney R.N. *Methods in Molecular Biology* **400** (2007) 171-177.
- [13] Leidy C, Wolkers WF, Jorgensen K, Mouritsen OG, Crowe JH *Biophys J* **80** (2001) 1819-1828.
- [14] Joanne P, Galanth C, Goasdoue N, Nicolas P, Sagan S, et al. *Biochim Biophys Acta* **1788** (2009) 1772-1781.
- [15] Srivastava, Vijay Kumar *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources* (2019) 125-137.