

Diss. ETH NO. 23416

COMPUTER-ASSISTED MORPHING OF MEMBRANE-INTERACTING PEPTIDES

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATHARINA STUTZ

Master of Science ETH in Pharmaceutical Sciences
ETH Zurich, Switzerland

Born on 05.09.1985

Citizen of Hombrechtikon and Russikon ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Gisbert Schneider, examiner,
Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner,
Prof. Dr. Paul Wrede, co-examiner

2016

2 Summary

The increase in antimicrobial-resistant pathogens and the stagnation in the development of new anti-infective agents are one of today's major public health threats. To reduce the speed of this development, proper handling of antimicrobials is essential, but most importantly, effort has to be undertaken in the research and development of new therapeutic approaches.

Antimicrobial peptides (AMPs) are expressed by all kind of biological realms and play an essential role in innate host defense strategies. Acting as design templates, they have emerged as a promising class of next generation anti-infective agents. AMPs are able to target and interact with biological membranes. This interaction may occur as the adsorption or integration of the peptide into the lipid bilayer and can even lead to membrane lysis. Specific lytic activity towards membranes of pathogens is their desirable mode of action. The initial contact between the peptide and the membrane is thought to take place via electrostatic and hydrophobic forces and without the need for specific targets, *e.g.* receptors. This fact and the bactericidal mechanism also led to the assumption that evolving antibiotic resistance is much more unlikely compared to conventional antibiotics.

Nuclear-encoded proteins destined for different cellular locations often contain certain amino acid stretches, so-called 'targeting sequences' or 'targeting peptides', which guide them to their destination, either into the secretory pathway of the endoplasmic reticulum (ER) or to other subcellular compartments. A class of targeting peptides poses proteins destined for mitochondria. They bear N-terminal sequence elongations, which are termed mitochondrial targeting peptides (mTPs). Most of the mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and directed to the mitochondrial membrane by the help of an mTP. After binding of the mTP to translocation complexes in the mitochondrial membrane, the protein precursor is transported into the mitochondrion where the mTP is cleaved by mitochondrial proteases.

In this study, we compared two classes of membrane-interacting peptides: AMPs, which exert membrane-lytic function, and mTPs that typically lack membrane-lytic activity. Besides their membrane-targeting capacities, both peptide classes share common structural features, specifically an overall positive net charge, amphipathic character and α -helical secondary structure elements.

In order to investigate the mutual and discriminating features of both peptide classes, we implemented a directed evolutionary algorithm ‘MoPED’ to stepwise convert (‘morph’) a membrane-lytic AMP into a non-membrane-lytic mTP and *vice versa*. Thereby, either a known mTP or AMP served as attractor point for evolutionary searching in sequence space. We designed and chemically synthesized 37 peptides, which we tested for membrane-lytic activity against four or five different lipid vesicle types and measured their capacity to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. Peptides derived from a MoPED run with focus on the mTP landscape were N-terminal fluorescently-labeled and tested for mitochondrial targeting function with isolated mitochondria using fluorescence microscopy. Thermodynamic interaction measurements of selected examples of this MoPED run with a selected vesicle type were performed by isothermal titration calorimetry (ITC). The structures of those peptides were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). In order to determine the inducible α -helical content of all synthesized peptides, we performed circular dichroism (CD) spectroscopy in water and in a ‘membrane-like’ environment.

We demonstrated successful morphing of an AMP into an mTP and *vice versa*, whereby a functional feature, either membrane-lytic activity or non-membrane-lytic activity combined with mitochondrial targeting capacity non-linearly decreased with increasing distance from the start to the end of the peptide. Bacterial growth inhibition experiments confirmed the applicability of the directed evolutionary morphing concept to designing membrane-interacting peptides. Moreover, we showed that bacteriostatic activity correlates with the inducibility of the peptides’ α -helicity.

The results obtained in this study corroborated the directed evolutionary peptide design approach by computational peptide morphing. The study sheds light on the activity landscape of membrane active peptides and enables their future rational design.

3 Zusammenfassung

Die Zunahme der antimikrobiellen Resistenz bei Pathogenen und der Stillstand in der Entwicklung von neuen Antiinfektiva gehören heute zu den bedeutendsten Problemen im Gesundheitswesen. Um der Geschwindigkeit dieser Entwicklung entgegenwirken zu können, ist ein angemessener Umgang mit antimikrobiellen Substanzen unabdingbar. Am wichtigsten ist jedoch, dass vor allem Anstrengungen in der Forschung und in der Entwicklung von neuen therapeutischen Möglichkeiten unternommen werden.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden in allen biologischen Organismen exprimiert und spielen eine essentielle Rolle bei Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems. Als Design-Vorlagen stellen sie eine vielversprechende Klasse von Antiinfektiva der nächsten Generation dar. AMPs sind imstande biologische Membranen anzusteuern und mit diesen zu interagieren. Eine solche Interaktion kann durch Adsorption an oder durch Integration in die Lipid-Doppelschicht erfolgen und kann sogar zu Membranlyse führen. Dabei ist eine spezifisch lytische Aktivität gegenüber Membranen von Pathogenen wünschenswert. Es wird angenommen, dass der initiale Kontakt zwischen Peptid und Membran durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet und ohne Nutzung spezifischer Zielstrukturen, wie zum Beispiel Rezeptoren, erfolgt. Diese Gegebenheit und auch der bakterizide Mechanismus lassen vermuten, dass eine antibiotische Resistenzentwicklung weniger wahrscheinlich ist, als im Vergleich mit herkömmlichen Antibiotika.

Proteine, die im Zellkern kodiert werden und für verschiedene zelluläre Orte bestimmt sind, weisen oft ganz bestimmte Aminosäuren-Abfolgen auf, so genannte 'Targetingsequenzen' oder 'Targetingpeptide', die das Protein zu seinem Zielort führen, entweder in den sekretorischen Weg des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder zu anderen subzellulären Kompartimenten. Eine Klasse von Targetingpeptiden umfassen Proteine, die für Mitochondrien bestimmt sind. Diese beinhalten N-terminale Sequenzverlängerungen, welche als mitochondriale Targetingpeptide (mTPs) bezeichnet werden. Die Mehrheit der mitochondrialen Proteine werden im Zytosol synthetisiert und mit Hilfe eines mTPs zur mitochondrialen Membran geleitet. Nachdem das mTP an Translokationskomplexe in der Mitochondrienmembran gebunden hat, wird das Vorläuferprotein in das Mitochondrion hinein transportiert, wo das mTP von mitochondrialen Proteasen abgeschnitten wird.

In dieser Studie haben wir zwei Klassen von Peptiden miteinander verglichen, die mit Membranen interagieren: AMPs, welche eine membranlytische Funktion ausüben und mTPs, welche typischerweise keine membranlytische Aktivität aufweisen. Nebst ihren Fähigkeiten Membranen anzusteuern, teilen sich beide Peptidklassen häufige strukturelle Eigenschaften, insbesondere: eine insgesamt positive Nettoladung, einen amphipathischen Charakter und α -helikale sekundäre Strukturelemente (Hancock & Lehrer 1998; von Heijne 2005).

Um die gemeinsamen und unterschiedlichen Merkmale beider Peptidklassen zu untersuchen, haben wir einen gerichteten evolutionären Algorithmus 'MoPED' mit dem Ziel implementiert, ein membranlytisches AMP in ein nicht-membranlytisches mTP und *vice versa* schrittweise umzuwandeln. Dabei diente entweder ein bekanntes mTP oder ein AMP als Attraktor für das evolutionäre Suchen im Sequenzraum. Wir entwarfen und synthetisierten 37 Peptide, welche wir bezüglich ihrer membranlytischer Aktivität auf vier, respektive fünf verschiedenen Vesikeltypen testeten und massen deren Fähigkeit das Wachstum von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zu hemmen. Peptide, die von einem MoPED-Lauf stammten, dessen Fokus auf die mTP-Landschaft gerichtet lag, wurden N-terminal fluoreszenzmarkiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Funktion, isolierte Mitochondrien anzusteuern, getestet. Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) wurden thermodynamische Interaktionsmessungen von ausgewählten Beispielen dieses MoPED-Laufes mit einem ausgesuchten Vesikeltyp durchgeführt. Die Strukturen dieser Peptide wurden mittels Kernspinresonanz (NMR) charakterisiert. Um den induzierbaren α -helikalen Anteil von allen synthetisierten Peptiden zu bestimmen, führten wir Zirkulardichroismus-Spektroskopie-Messungen (CD) jeweils in Wasser und in einer membranähnlichen Umgebung durch.

Wir zeigten das erfolgreiche Umwandeln eines AMPs in ein mTP und *vice versa*, wobei ein funktionelles Merkmal, wie entweder membranlytische oder nicht-membranlytische Aktivität, kombiniert mit der Eigenschaft Mitochondrien anzusteuern, mit zunehmender Distanz vom Start- zum Endpeptid nichtlinear abnahm. Die Resultate der bakteriellen Wachstumshemmung bestätigten die Anwendbarkeit des gerichteten evolutionären Umwandlungskonzepts für das Design von membraninteragierenden Peptiden. Ausserdem zeigten wir, dass die bakteriostatische Aktivität mit der α -helikalen Induzierbarkeit von Peptiden korreliert.

Die erlangten Resultate in dieser Studie bestätigten den Ansatz des gerichteten evolutionären Peptiddesigns mittels computerbasierter Peptidumwandlung. Die Studie gab Aufschluss über die Aktivitätslandschaft von membranaktiven Peptiden und erlaubt deren zukünftiges rationales Design.