

Proline-Rich Peptides – From Molecular Receptors to Antimicrobial Agents

Doctoral Thesis

Author(s):

Loosli, Simon

Publication date:

2021

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000496855>

DISS ETH Nr. 27654

Proline-Rich Peptides – From Molecular Receptors to Antimicrobial Agents

A dissertation submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Simon Loosli

Master of Science ETH in Chemie, ETH Zurich

born on *08.11.1988*

citizen of *Wyssachen (BE), Switzerland*

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Helma Wennermers, *examiner*

Prof. Dr. Donald Hilvert, *co-examiner*

2021

Abstract

Peptides have a broad scope of applications, ranging from drug discovery through molecular recognition, catalysis, all the way to organic materials. This is due to both their bioavailability and biocompatibility but also their modularity and capacity for structural and functional fine-tuning. In this thesis, short proline-rich peptides were used as receptors for the amino acid arginine and the second messengers c-di-GMP and c-di-AMP. Additionally, some of the peptides showed promising antimicrobial properties towards *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

In the first part of this thesis, we investigated the binding selectivity of previously described cyclic proline-rich peptides towards arginine, lysine and their derivatives with different states of side-chain methylation. Naphthylproline-containing peptides displayed a 28-fold selectivity for binding of arginine over lysine in acetone. This is the most selective small molecule receptor for arginine over lysine reported to date. The selectivity most probably arises from the narrow binding cavity of the cyclic peptides, favouring binding of cations with a planar rather than a spherical shape. In order to study binding of arginine and lysine in water, water-soluble analogues of naphthylproline-containing peptides were prepared. This was achieved by introducing an oxygen into the linker connecting the naphthyl substituents to the proline residues. The water-soluble, naphthyl-functionalized cyclic peptides showed binding affinities in the low millimolar range towards arginine in water. However, the selectivity for arginine over lysine, which was observed in acetone, was not maintained in water.

In the second part of this thesis, we synthesised a pentapeptide library to identify selective binders for c-di-GMP. We identified peptides with binding affinities in the low micromolar to nanomolar range and obtained selectivities of up to 50-fold for c-di-GMP over c-di-AMP. Furthermore, the peptides identified in the library screening and their rationally designed derivatives reduced the bacterial biomass of the human pathobionts *P. aeruginosa* (IC₅₀ values ranging from 2 µM to 134 µM) and *S. aureus* (IC₅₀ values ranging from 0.4 µM to 5 µM), whereby all of the peptides were more potent towards biomass reduction of *S. aureus* compared to *P. aeruginosa*. Additionally, colony forming unit determinations revealed that all peptides were bactericidal towards *S. aureus* at their minimal inhibitory concentrations (MICs ranging from 1 µM to 30 µM), whereas for *P. aeruginosa* (MIC ranging from 5 µM to 2000 µM) we observed both bactericidal and bacteriostatic modes of action (MOAs). Therefore, the studied peptides might have different MOAs for killing the multi-drug resistant bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Furthermore, MTT assays revealed that most peptides did not show considerable cytotoxicity to HeLa cells up to a concentration of 1 mM. These results indicate that a large pharmacological

window exists between the active anti-microbial concentration and cytotoxic concentration (6 up to > 250-fold). This makes our peptides promising candidates for further investigation as bactericidal and antibiotic agents for use in the clinic.

In the third part of the thesis, we synthesised fluorescent analogues of the second messenger binding peptides studied in Part 2 and explored their internalisation by HeLa cells and *P. aeruginosa*. Confocal microscopic imaging with lysotracker as co-stain indicated that the peptides most probably end up in lysosomes in HeLa cells. In *P. aeruginosa*, the peptides were mostly equally distributed throughout the bacteria, but in some cases we could observe a polarisation of the fluorescence to the cell poles. Additionally, we synthesised peptides functionalized with a super high-resolution dye. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) experiments with these peptide conjugates and *P. aeruginosa* corroborated the localisation of the peptides at the cell poles and showed that they mostly co-localized with Syto13, an intracellular nucleic acid dye.

Zusammenfassung

Peptide finden ein breites Anwendungsspektrum, das von der Arzneimittelforschung über molekulare Rezeptoren bis hin zu Nanomaterialien reicht. Dies ist sowohl auf ihre Bioverfügbarkeit und -kompatibilität als auch auf ihre Fähigkeit zur strukturellen und funktionellen Feinabstimmung zurückzuführen. In dieser Arbeit wurden kurze Prolin-reiche Peptide als Rezeptoren für Arginin und die sekundären Botenstoffe c-di-GMP und c-di-AMP verwendet. Zusätzlich zeigten einige der Peptide vielversprechende antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*.

Im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten wir die Bindungsselektivität von zuvor beschriebenen zyklischen prolinreichen Peptiden gegenüber Arginin, Lysin und deren Derivaten mit unterschiedlichen Seitenkettenmethylierung. Naphthylprolin-haltige Peptide zeigten eine 28-fache Selektivität für die Bindung von Arginin gegenüber Lysin in Aceton. Dies ist der selektivste niedermolekulare Rezeptor für Arginin, welcher bis heute beschrieben wurde. Die Selektivität resultiert wahrscheinlich aus dem engen Bindungshohlraum der zyklischen Peptide, der die Bindung von planaren gegenüber sphärischen Kationen begünstigt. Um die Bindung von Arginin und Lysin in Wasser zu untersuchen, wurden wasserlösliche Analoga von naphthylprolinhaltigen Peptiden hergestellt. Dies wurde durch die Einführung eines Sauerstoffs in den Linker erreicht, der die Naphthylsubstituenten mit den Prolinresten verbindet. Die wasserlöslichen, Naphthyl-funktionalisierten cyclischen Peptide zeigten eine Bindungsaffinität im niedrigen millimolaren Bereich gegenüber Arginin in Wasser. Die Selektivität für Arginin gegenüber Lysin, die in Aceton beobachtet wurde, konnte in Wasser jedoch nicht aufrechterhalten werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit haben wir eine pentamere Peptidbibliothek synthetisiert, um selektive Binder für c-di-GMP zu identifizieren. Wir identifizierten Peptide mit Bindungsaffinitäten im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich und erzielten exzellente Selektivitäten, von bis zu 50-fach, für c-di-GMP gegenüber c-di-AMP. Darüber hinaus reduzierten die im Bibliotheks-Screening identifizierten Peptide und rational abgeleitete Derivate die bakterielle Biomasse der humanen Pathobionten *P. aeruginosa* (IC₅₀-Werte im Bereich von 2 µM bis 134 µM) und *S. aureus* (IC₅₀-Werte im Bereich von 0,4 µM bis 5 µM), wobei alle Peptide potenter in Bezug auf die Biomassenreduktion von *S. aureus* gegenüber *P. aeruginosa* waren. Darüber hinaus ergaben die Bestimmungen der koloniebildenden Einheiten, dass alle Peptide bei ihren minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs im Bereich von 1 µM bis 30 µM) gegenüber *S. aureus* bakterizid waren, während wir bei *P. aeruginosa* (MHKs im Bereich von 5 µM bis 2000 µM) sowohl bakterizide als auch bakteriostatische Wirkungsweisen beobachteten. Daher könnten die untersuchten Peptide alternative Wirkungsweisen haben, die eine effiziente Abtötung der multiresistenten

Bakterien *P. aeruginosa* und *S. aureus* ermöglichen. Darüber hinaus zeigten Zytotoxizitäts-Assays, dass die meisten Peptide bis zu einer Konzentration von 1 mM keine nennenswerte Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein großes pharmakologisches Fenster zwischen der aktiven antimikrobiellen Konzentration und der zytotoxischen Konzentration existiert (6 bis > 250-fach). Dies stellt unsere Peptide als vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen als bakterizide und antibiotische Wirkstoffe für den Einsatz in der Klinik dar.

Im dritten Teil der Arbeit synthetisierten wir fluoreszierende Analoga der in Teil 2 untersuchten sekundäre Botenstoff-bindenden Peptide und untersuchten deren Internalisierung in HeLa-Zellen und *P. aeruginosa*. Konfokalmikroskopische Untersuchungen dieser Peptide mit LysoTracker als Co-Färbemittel zeigten, dass die Peptide in HeLa-Zellen höchstwahrscheinlich in Lysosomen enden. In *P. aeruginosa* waren die Peptide meist gleichmäßig in den Bakterien verteilt, in einigen Fällen konnten wir jedoch eine Polarisierung der Fluoreszenz zu den Zellpolen beobachten. Zusätzlich synthetisierten wir Peptide, die mit einem superhochauflösenden Farbstoff funktionalisiert waren. Stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) Experimente mit diesen Peptidkonjugaten und *P. aeruginosa* zeigten, dass die Peptide ebenfalls an den Zellpolen lokalisiert waren und meist mit Syto13, einem intrazellulären Nukleinsäure Farbstoff, kolokalisieren.