



Dottorato di ricerca in  
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci  
X ciclo nuova serie  
2008-2012

## **Membrane proteins and virulence pathways: new approaches to design antimicrobial peptides**

**Dottoranda**      **Ilaria Granata**

**Tutor**            **Ch.mo Prof. Bruno Maresca**

**Coordinatore**    **Ch.ma Prof.ssa Antonietta Leone**

In the last two decades many studies have shown that lipid composition of biologic membranes as well as their structure have a primary role in cellular signaling.

In particular, the research group in which I have worked for my PhD thesis, has demonstrated that the primary sensor of temperature variations and, in general, of other kinds of stress is localized in the membrane. The imbalance in the membrane lipid/protein ratio of the pathogen *Salmonella* Typhimurium, due to over-expression either of the protein  $\Delta^{12}$ -desaturase of the cyanobacterium *Synechocystis* or individually expressed membrane regions of the enzyme, caused major changes in the MPS (Membrane Physical State) and a significant impairment of the heat shock response (Porta *et al.* 2010). These results highlighted the possibility to identify molecules that, interacting with specific membrane lipids, can modify the functionality of membrane itself and consequently the biochemical/genetical properties of the whole cell. About thirty years ago, antimicrobial peptides (AMPs), molecules that are part of an ancient mechanism of the innate immunity of all Metazoa and plants, have been identified. However, from the over 1,000 identified peptides, no *consensus* sequence has been recognized and thus, as to-day, the possibility to predict and design an active AMP is still not feasible.

Starting from these assertions, through the study of membrane proteins and virulence pathways, my project has focused on the rational design of new AMPs and identification of key rules that allow the correct insertion of short peptides inside the phospholipid bilayer.

The amino acid sequence of the first *trans*-membrane region (p200) of the  $\Delta^{12}$ -desaturase, that was shown to have antimicrobial activity (AMA), has been reduced to identify the minimal active sequence. Thus, three peptides, called A2/I2, A3/I3 and A4/I4, have been designed and their corresponding oligos inserted into the vector pBAD. The plasmids were used to transform *S. Typhimurium* LT2 strain. Transformants were then tested in terms of growth and survival outside and inside host cells (murine macrophages,  $\phi$ ). The results have shown that trimming of p200 determined a reduction of its AMA.

Further, it is well acknowledged that almost all, if not all, membrane proteins have more lysine and arginine residues on the sides of *trans*-membrane protein domains, and these residues are necessary for the insertion of proteins into the membrane bilayer. Thus, to verify the importance of this rule, called "positive inside rule", a scrambled sequence of p200 has been designed, maintaining unchanged the five aminoacids preceding the *trans*-membrane region. From the growth curve and *in vitro* infection it was observed that p200 scrambled conserved the same activity of the original sequence, as expected.

Studying the virulence mechanisms of *Salmonella* survival inside host cells, the protein PhoQ of the two components system PhoP/PhoQ has been identified as the protein mostly involved in sensing and responding to  $\phi$  environment and as a likely target to develop a new AMP. Based on our model, an AMP has AMA if it can interfere with lipids/proteins interaction of a specific domain and if this domain has a fundamental role in the pathogen's survival and/or growth. Thus, the original sequence of the first *trans*-membrane region of PhoQ has been modified, obtaining two potential AMP candidates. The two resulting sequences, called NUF and STA, have been cloned and expressed in *Salmonella*. In particular, the peptide NUF has been very promising in determining the decrease of *Salmonella* persistence inside  $\phi$ .

Based on these results, to make sure that the peptide NUF interfered with PhoP/PhoQ system, real time PCR analysis has been performed to determine transcript level of *rstA*, one of the genes regulated by PhoP/PhoQ system. The experimental procedures involved the growth of the strain expressing NUF and control strain in two different conditions, low and high  $Mg^{2+}$  concentration, that determine the activation and repression of PhoQ respectively. Furthermore, RNA deep sequencing analysis has been performed using the same experimental conditions of qRT-PCR, highlighting the down- and up-regulated genes in response to the expression of the peptide NUF. Finally, PhoQ protein of *Salmonella* has been purified to be reconstituted inside proteoliposomes to develop a fast screening method for testing peptides activity.

The most promising peptides, p200, p212 and NUF have been used for *in vivo* survival experiments with C57/B6 mice. Since encouraging results with peptide p200 have been obtained, it has been tested whether *Salmonella* expressing p200 induced protection and immunological memory in mice when rechallenged with the wild type virulent strain. Mice injected with *Stm*(p200) developed *Salmonella*-specific memory Th1 response and produced elevated serum levels of anti-*Salmonella* antibodies IgG2b.

Negli ultimi due decenni numerosi studi hanno dimostrato che la composizione lipidica e la struttura delle membrane biologiche hanno un ruolo fondamentale nel *signaling* cellulare. In particolare, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio progetto di dottorato, ha dimostrato che il sensore principale delle variazioni di temperatura, ed, in generale, di altri tipi di stress, è localizzato a livello della membrana. Il disequilibrio del rapporto lipidi/proteine di membrana del patogeno *Salmonella* Typhimurium, dovuto alla sovra-espressione sia della proteina  $\Delta^{12}$ -desaturasi del cianobatterio *Synechocystis* che delle regioni di membrana dell'enzima individualmente espresse, ha causato alterazioni dello stato fisico della membrana (MPS) e un significativo danneggiamento della risposta heat shock (Porta *et al.* 2010). Questi risultati hanno messo in luce la possibilità di identificare molecole che, interagendo con specifici lipidi di membrana, siano in grado di modificare la funzionalità della membrana stessa e di conseguenza le proprietà biochimiche e genetiche dell'intera cellula. Circa trent'anni fa, sono stati identificati i peptidi antimicrobici (AMPs), molecole appartenenti ad un antico meccanismo dell'immunità innata di tutti i Metazoa e delle piante. Tuttavia, dagli oltre 1,000 peptidi identificati non è stato possibile derivare alcuna sequenza *consensus* che permetta un disegno razionale di un AMP attivo.

Partendo da queste considerazioni, mediante lo studio di proteine di membrana e *pathways* di virulenza, il mio progetto ha avuto come oggetto di studio il disegno di nuovi AMPs e l'identificazione delle regole chiave che permettono il corretto inserimento di un peptide all'interno del *bilayer* fosfolipidico.

A tale proposito, la sequenza amminoacidica della prima regione *trans*-membrana della  $\Delta^{12}$ -desaturasi (p200), dotata di attività antimicrobica (AMA), è stata ridotta al fine di identificare la minima sequenza attiva. Sono stati quindi disegnati tre peptidi, denominati A2/I2, A3/I3 and A4/I4, i cui oligo corrispondenti sono stati inseriti nel vettore di espressione pBAD e i plasmidi ottenuti sono stati usati per trasformare *S. Typhimurium* LT2. I trasformanti sono stati in seguito testati in termini di crescita e sopravvivenza al di fuori e all'interno di cellule ospiti (macrofagi murini,  $\phi$ ). I risultati hanno dimostrato che la riduzione della lunghezza della sequenza di p200 ha determinato anche la riduzione della sua AMA.

Inoltre, dalla letteratura è noto che quasi tutte, se non tutte, le proteine di membrana presentano una maggiore percentuale di residui di arginina e lisina ai lati dei domini *trans*-membrana, necessari per il corretto inserimento delle proteine stesse nel *bilayer* di membrana. Al fine di verificare l'importanza di questa "positive inside rule" nel direzionamento dei peptidi in membrana, la sequenza di p200 è stata modificata alterando l'ordine degli amminoacidi della regione *trans*-membrana e mantenendo invariati i 5 amminoacidi precedenti la medesima regione. Dalle curve di crescita e dall'infezione *in vitro* è stato osservato che il peptide p200 "scrambled" ha conservato la medesima efficacia della sequenza originale, come era atteso.

Mediante lo studio dei meccanismi di virulenza responsabili della sopravvivenza di *Salmonella* all'interno delle cellule ospiti, è stata identificata la proteina PhoQ del sistema a due componenti PhoP/PhoQ quale proteina fortemente coinvolta nel *sensing* e nella risposta all'ambiente macrofagico, e quindi potenziale target per l'attività di nuovi AMPs. Secondo il modello ipotizzato, un AMP presenta AMA se in grado di interferire con le interazioni lipidi/proteine di uno specifico dominio e se questo dominio ha un ruolo fondamentale nella sopravvivenza e/o crescita del patogeno. A tal proposito, è stata modificata la sequenza della prima regione *trans*-

membrana di PhoQ, ottenendo due potenziali candidati AMP. Le due sequenze risultanti, denominate NUF e STA, sono state clonate ed espresse in *Salmonella*. In particolare, il peptide NUF ha mostrato risultati promettenti, determinando la riduzione della capacità di persistenza di *Salmonella* all'interno dei  $\phi$ .

Al fine di verificare che l'attività del peptide NUF fosse dovuta ad un'alterazione a livello del sistema PhoP/PhoQ, è stata effettuata un'analisi di real time PCR per poter determinare i livelli di trascritto di *rstA*, uno dei geni regolati dal sistema in questione. L'esperimento è stato condotto crescendo il ceppo esprimente NUF e il ceppo di controllo in due differenti condizioni ambientali, bassa ed alta concentrazione di  $Mg^{2+}$ , che determinano rispettivamente l'attivazione e la repressione di PhoQ.

E' stata successivamente effettuata un'analisi di RNA deep sequencing, utilizzando le medesime condizioni sperimentali della qRT-PCR, che ha permesso l'identificazione dei geni sotto e sovra-regolati in seguito all'espressione del peptide NUF. Infine, la proteina PhoQ di *Salmonella* è stata purificata per essere successivamente ricostituita in proteoliposomi al fine di mettere a punto un sistema di *screening* rapido dell'attività di nuovi peptidi.

I peptidi considerati più interessanti in seguito alla sperimentazione *in vitro* sono stati utilizzati in esperimenti di infezione *in vivo* di topi C57/B6. Dal monitoraggio della sopravvivenza dei topi infettati i risultati sono stati particolarmente incoraggianti nel caso del ceppo di *Salmonella* esprimente il peptide p200.

I topi infettati con il ceppo *Stm*(p200) hanno difatti sviluppato memoria Th1 *Salmonella*-specifico e hanno prodotto elevati livelli sierici di anticorpi anti-*Salmonella* appartenenti all'isotipo IgG2b.