

Análisis conformacional de un fragmento peptídico del primer bucle extracelular del receptor tipo 1 de angiotensina humano

Conformational analysis of a peptide fragment from first extracelular loop of the receptor human type 1 of angiotensin

Nélida Marín Huachaca¹, Clóvis R. Nakaie² y Shirley Schreier¹

¹ Departamento de Bioquímica de la Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP: 05513-970 São Paulo, Brasil

² Departamento de Biofísica de la Universidade Federal de São Paulo, Rua 3 de Maio 100, CEP: 04044-020, São Paulo, Brasil.

Recibido el 15 de noviembre del 2017, aceptado el 20 de diciembre del 2017

Resumen

El receptor tipo 1 de angiotensina (AT₁) es mediador importante de las funciones vasoconstrictoras de la angiotensina II. Durante el proceso de activación del receptor, éste sufre alteración estructural que conlleva al proceso de transducción de señal. En el presente estudio se investigaron las propiedades conformacionales del fragmento peptídico Ac-YRWPFNGNYL-CONH₂ (fEC1) correspondiente al primer bucle extracelular del receptor AT₁ humano tanto en medio acuoso como en la presencia de sistemas que mimetizan la membrana biológica. De esta manera, se utilizaron micelas y vesículas unilamelares grandes (LUV) -tanto de naturaleza aniónica como zwitteriónica- como sistemas biomiméticos. Las micelas fueron preparadas a partir de los lisofosfolípidos: 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina (LPC) y 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilglicerol (LPG), mientras que, las LUV fueron preparadas a partir de 1-palmitoil-1-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) y 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG). El péptido fue sintetizado por el método de síntesis en fase sólida y los análisis conformacionales fueron realizados mediante dicroísmo circular. Los experimentos fueron realizados en pH 7.0. En este pH la carga teórica de fEC1 es +1. El espectro de dicroísmo circular de fEC1 en solución presentó una banda positiva en aproximadamente 226 nm, mientras que, en la presencia de micelas zwitteriónicas y aniónicas y, en la presencia de LUV aniónicas fueron observadas alteraciones espectrales, esto es, la adquisición de estructura secundaria del péptido como consecuencia de la interacción péptido-sistema biomimético.

Descriptores: *Receptor AT₁ humano, dicroísmo circular, micelas, vesículas unilamelares grandes*

Abstract

The type 1 receptor for angiotensin (AT₁) is an important mediator of the vasoconstrictor functions of angiotensin II. During the activation process of the receiver, it undergoes structural alteration that leads to the process of signal transduction. In the present study, the conformational properties of the peptide fragment Ac-YRWPFNGNYL-CONH₂ (fEC1) corresponding to the first extracellular loop of the human AT₁ receptor both in aqueous medium and in the presence of systems that mimics the biological membrane were investigated. In this way, micelles and large unilamellar vesicles (LUV) -both anionic and zwitterionic in nature- were used as biomimetic systems. The micelles were prepared from the lysophospholipids: 1-palmitoyl-2-hydroxy-phosphatidylcholine (LPC) and 1-palmitoyl-2-hydroxy-phosphatidylglycerol (LPG), whereas, the LUV were prepared from 1-palmitoyl- 1-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG). The peptide was synthesized by the solid phase synthesis method and the conformational analyzes were performed by circular dichroism. The experiments were performed at pH 7.0. At this pH the theoretical

charge of fEC1 is $+1$. The circular dichroism spectrum of fEC1 in solution showed a positive band at approximately 226 nm, whereas in the presence of zwitterionic and anionic micelles and, in the presence of anionic LUV, spectral alterations were observed, that is, the acquisition of secondary structure of the peptide as a consequence of the peptide-biomimetic system interaction.

Keywords: Human AT_1 receptor, circular dichroism, micelles, large unilamellar vesicles

1. Introducción

El receptor tipo 1 de angiotensina (AT_1) es responsable de virtualmente todas las acciones fisiológicas de la angiotensina II. Ha sido extensivamente estudiado mediante mutagénesis sitio-dirigida con el propósito de elucidar sus propiedades tales como unión con el agonista, transducción de señal, fosforilación, unión a arrestinas, internalización, desensibilización taquifilaxis, entre otras [1]. El receptor AT_1 es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a Proteínas G (GPCR). De manera general, la estructura de los GPCR se caracteriza por presentar las siguientes regiones: (i) región extracelular, que consiste de un dominio N-terminal y de tres bucles extracelulares; (ii) región de transmembrana (TM), que consiste de siete α -hélices, y (iii) región intracelular, que consiste de tres bucles intracelulares, una hélice anfipática intracelular y un dominio C-terminal. La activación de los GPCR comprende la unión del ligando a la parte extracelular de la región TM y la región extracelular resultando en pequeños cambios conformacionales en el core TM. Esto conduce a mayores rearrreglos estructurales en el lado citoplasmático de la interface transmembrana-intracelular, facilitando la unión de efectores intracelulares, proteína G, a la región intracelular [2, 3]. Los GPCR son mediadores de la mayoría de las respuestas fisiológicas a hormonas, neurotransmisores, entre otros. Su disfunción causa enfermedades, por ello muchos GPCR presentan un gran potencial como blancos de agentes farmacológicos [4, 5]. En este sentido es importante comprender la base estructural de la función de los GPCR [6, 7]. Sin embargo, las bases moleculares y estructurales de las funciones de los GPCR permanece limitado debido a dificultades relacionadas a su sobreexpresión, purificación y estabilización. Excepto para la rodopsina, cuya estructura cristal fue determinada a partir de su extracción de la retina de bovino [8] la baja abundancia natural de los GPCR generalmente impide su purificación en cantidades bioquímicamente relevantes.

Actualmente la estructura cristalina del receptor de AII no está determinada, sin embargo, han sido descritas las propiedades conformacionales de

varios fragmentos peptídicos correspondientes a diferentes dominios del receptor de angiotensina de rata (receptor AT_{1A}) [9 – 14]. En general, los estudios muestran que, las conformaciones de los fragmentos peptídicos pueden ser moduladas por la concentración del péptido y por las condiciones del medio, tales como, pH, fuerza iónica y constante dieléctrica. Es importante mencionar que, en la mayoría de los casos, los péptidos son capaces de adquirir las conformaciones predichas para esos dominios en la proteína entera [2]. Otro aspecto a considerar es que los GPCR están inmersos en la membrana biológica y ésta modula sus propiedades conformacionales.

El dicroísmo circular (CD) es una de las técnicas físicas más sensibles para determinar propiedades conformacionales y monitorear cambios conformacionales de biomoléculas. CD consiste en la absorción diferencial de los componentes circularmente polarizados a la derecha y a la izquierda de la radiación plano-polarizada. Este efecto ocurre cuando un cromóforo es quiral (ópticamente activo), (a) intrínsecamente por su estructura, o (b) por estar covalentemente unido a un centro quiral, o (c) por estar presente en un ambiente asimétrico [15]. En el caso de proteínas y péptidos, en la región UV lejano (240 – 180 nm), que corresponde a la absorción del enlace peptídico, el espectro de CD puede brindar información sobre el contenido de características estructurales secundarias. La absorción diferencial de la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda es de acuerdo al conjunto de ángulos de torsión ϕ y ψ del enlace peptídico. La absorción del enlace peptídico puede experimentar dos transiciones electrónicas: $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es la de mayor energía porque se pasa de un orbital enlazante a uno antienlazante, y presenta una banda positiva entre 185 y 200 nm; la transición $n \rightarrow \pi^*$ es de menor energía ya que se pasa de un orbital no enlazante a uno antienlazante, y presenta una banda negativa entre 215 y 230 nm. El presente estudio tiene por objetivo investigar las propiedades conformacionales de fEC1 (correspondiente a los residuos de aminoácidos 92 – 100) del primer bucle extracelular del receptor AT_1 humano tanto en solución como en la presencia de sistemas que mimetizan la membrana biológica tales

como micelas y vesículas unilamelares grandes.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Péptido: Ac-YRWPFNGNYL-CONH₂ (fEC1) (P.M. 1256.42), sintetizado en el Departamento de Biofísica de la Universidade Federal de São Paulo empleando el método de síntesis en fase sólida [16 17].

Fosfolípidos (Avanti Polar Lipids, Inc.): 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) (P.M. 760.10 g/mol) y 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) (P.M. 770.99 g/mol).

Lisofosfolípidos (Avanti Polar Lipids, Inc.): 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina (LPC) (P.M. 495.64 g/mol) y 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilglicerol (LPG) (P.M. 506.55 g/mol).

2.2 Métodos

Determinación de la concentración del péptido:

La concentración de una solución de fEC1 en tampón PBC (fosfato-borato-citrato) 10 mM, pH 7.0, fue determinada de acuerdo a Pace et al. (1995) [18] en un espectrofotómetro UV-Vis Hitachi modelo U-2010 usando cubetas de cuarzo de camino óptico 0.5 cm. El tampón PBC 10 mM fue preparado con los siguientes reactivos: ácido cítrico trisódico (P.M. 294.10 g/mol), ácido bórico cristalino (P.M. 61.83 g/mol) y fosfato diácido de sodio dihidratado (P.M. 156.01 g/mol).

Preparación de vesículas y micelas:

La concentración de las soluciones patrón de los fosfolípidos fue determinada mediante el método de Rouser et al. (1970) [19]. Las vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*, LUV) fueron preparadas mediante extrusión con el empleo de membranas de policarbonato que presentaban poros de 100 nm de diámetro. Fue utilizado el aparato extrusor Liposofast, de AVESTIN, Ottawa - Canadá). Se prepararon soluciones micelares de LPC y LPG (200 mM). Para ello, una masa determinada de lisofosfolípido fue disuelta en un volumen determinado de tampón PBC 10 mM, pH 7.0.

Obtención de los espectros

Los espectros de CD en la región UV lejano fueron adquiridos como un promedio de 6 varreduras de

190 a 260 nm en un espectropolarímetro JASCO modelo J-715 utilizando una cubeta circular de cuarzo con camino óptico de 0.05 cm. La velocidad de adquisición de los espectros fue de 50 nm/min y tiempo de integración 8 s/punto. La concentración de fEC1 fue de 60 μM.

Los experimentos en temperatura ambiente (22 ± 1 °C).

3. Resultados y discusión

El fragmento peptídico fEC1, cuya secuencia corresponde al primer bucle extra-celular del receptor AT₁ humano, posee nueve residuos de aminoácidos de los cuales tres presentan grupos ionizables: Tyr⁹², Arg⁹³ y Tyr⁹⁹. En el receptor AT_{1A} el residuo Tyr⁹² es uno de los residuos importantes para la interacción con el agonista [20].

En las figuras 1 y 2 se presentan los espectros de CD de fEC1 en diferentes concentraciones de micelas de LPC y de LPC:LPG (1:1, mol:mol) respectivamente, mientras que, en las figuras 3 y 4 se muestran los espectros de CD de LUV de POPC y de POPC:POPG (1:1, mol:mol) respectivamente, en pH neutro. De acuerdo a un estudio anterior [21] en pH 7.0, próximo al pH fisiológico la carga teórica del péptido es +1.

En ambiente acuoso, el espectro de CD de fEC1 presenta una banda positiva entre 226 y 228 nm que generalmente es atribuida a residuos aromáticos [22]. También es observada una banda negativa centrada en cerca de 200 nm que es característica de una estructura flexible en equilibrio dinámico entre varias conformaciones, tal como fue observado para el fragmento peptídico Tyr⁹²-Arg-Trp-Pro-Phe-Gly-Asn-His-Leu¹⁰⁰-NH₂ que corresponde al bucle ECL1 del receptor AT_{1A} (SALINAS ET AL., 2002).

En medio micelar, el péptido fEC1 presentó alteraciones espectrales. La banda centrada en ~ 226 nm, que corresponde a los residuos aromáticos, se desplaza en la presencia de LPC (figura 1) y LPC:LPG (figura 2) para ~ 232 nm y presenta menor intensidad, además se observa la aparición de una banda negativa centrada en ~ 218 nm y una banda positiva en ~ 200 nm.

Estas alteraciones espectrales indican que fEC1 interactúa con las micelas con adquisición de estructura secundaria.

En la figura 3 se observa que con el aumento de concentración de fosfolípido zwitteriónico no hay

cambios conformacionales notables del péptido fEC1 como en los casos observados en la presencia de las micelas.

unilamelares grandes, el fragmento peptídico fEC1 sufre alteración conformacional en comparación a la conformación presentada en solución acuosa.

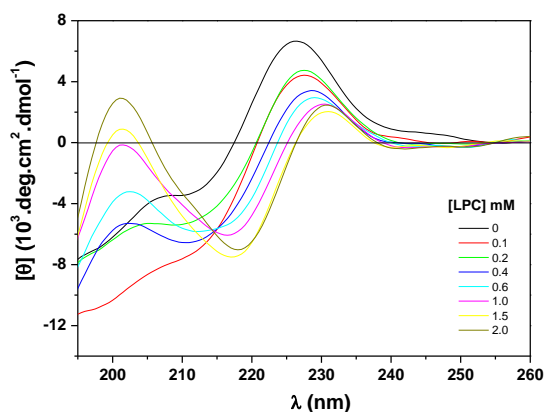


Figura 1. Espectros de CD de fEC1 en la presencia de micelas de LPC.

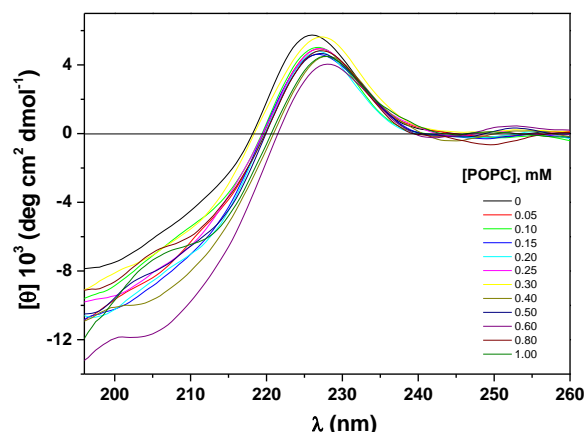


Figura 3. Espectros de CD de fEC1 en la presencia de LUV de POPC.

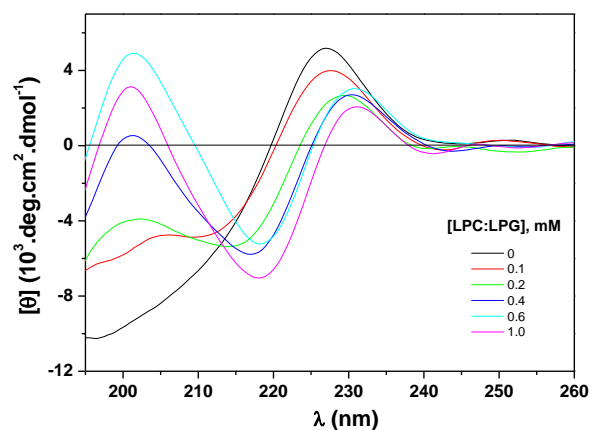


Figura 2. Espectros de CD de fEC1 en la presencia de micelas de LPC:LPG (1:1, mol:mol).

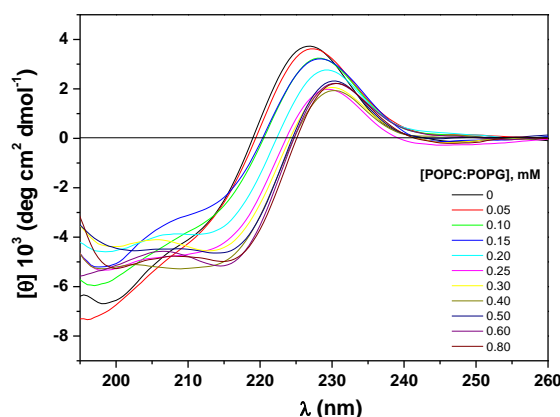


Figura 4. Espectros de CD de fEC1 en la presencia de LUV de POPC:POPG (1:1, mol:mol).

En la presencia de LUV de POPC:POPG (figura 4) se observa desplazamiento de la banda positiva (entre 226 y 228) para longitudes de onda mayores con el aumento de la concentración de vesícula, pero a partir de 0.25 mM la banda permanece centrada en torno de 232 nm, tal como fue observado en la presencia de micelas; también se observa la banda negativa en ~ 218 nm y ausencia de la banda positiva en ~ 200 nm.

4. Conclusiones

En la presencia de sistemas miméticos de membrana biológica –micelas y vesículas

Esta alteración conformacional puede estar relacionada a la adquisición de una conformación bioactiva lo cual es un factor importante para comprender los procesos de transducción de señal.

Agradecimientos

Nuestro profundo agradecimiento al *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) por el soporte financiero para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Referencias

- [1] C. Oro, H. Qian, and W.G. Thomas. *Pharmacology & Therapeutics* **113** (2007) 210–226.
- [2] P.L. Yeagle and A.D. Albert. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (2007) 808-824.
- [3] A.J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon, C.G. Tate, G.F. Schertler, and M.M. Babu. *Nature* **494** (2013) 185-194.
- [4] D. Wootten, A. Christopoulos, and P.M. Sexton. *Nature* **12** (2013) 630 – 644.
- [5] K.A. Jacobson. *Biochem. Pharmacol.* **98** (2015) 541–555.
- [6] D. M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, and B.K. Kobilka. *Nature* **459** (2009) 356 – 363.
- [7] V. Katritch, V. Cherezov, and R.C. Stevens. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **53** (2013) 531–556.
- [8] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano. *Science* **289** (2000) 739-745.
- [9] L. Franzoni, G. Nicastro, T.A. Pertinhez, M. Tatò, C.R. Nakaie, A.C.M. Paiva, S. Schreier, and A. Spisni. *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 9734–9741.
- [10] L. Franzoni, G. Nicastro, T.A. Pertinhez, E. Oliveira, C.R. Nakaie, A.C.M. Paiva, S. Schreier, and A. Spisni. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 227-235.
- [11] S.M. de Noronha, S.A. Corrêa, E.F. Poletti, D.D. Lopes, C.C. da Silva, M.L. Sforça, S.I. Shimuta, N.I. Zanchin, C.R. Nakaie, and I.D. da Silva. *Neuropeptides* **44** (2010) 115-118.
- [12] T.A. Pertinhez, R. Krybus, E.M. Cilli, A.C.M. Paiva, C.R. Nakaie, L. Franzoni, G. Sartor, A. Spisni, and S. Schreier. *J. Pept. Sci.* **8** (2002) 23-35.
- [13] R.K. Salinas, C.S. Shida, T.A. Pertinhez, A. Spisni, C.R. Nakaie, A.C.M. Paiva, and S. Schreier. *Biopolymers* **65** (2002) 21-31.
- [14] A. Spisni, L. Franzoni, G. Sartor, C.R. Nakaie, R.S.H. Carvalho, A.C.M. Paiva, R.K. Salinas, T.A. Pertinhez, and S. Schreier. *Bull. Magn. Res.* **17** (1996) 151-153.
- [15] S.M. Kelly, T.J. Jess, and N.C. Price. *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119-139.
- [16] R.B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2149-2154.
- [17] J.M. Stewart and J.D. Young. *Solid phase peptide synthesis*, 2nd ed., (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984), pp. 1 – 176.
- [18] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. *Protein Sci.* **4** (1995) 2411-2423.
- [19] G. Rouser, S. Fkeischer, and A. Yamamoto. *Lipids* **5** (1970) 494-496.
- [20] S.A. Hjorth, H.T. Schambye, W.J. Greenlee, and T.W. Schwartz. *J. Biol. Chem.* **269** (1984) 30953-30959.
- [21] N. Marín Huachaca, C.R. Nakaie, and S. Schreier. *Revista ECIPerú* **13** (2016) 17-24.
- [22] M.G. Mulkerrin. *Protein structure analysis using circular dichroism. In: Spectroscopic methods for determining protein structure in solution* (VCH Publishers, Inc., New York, 1996).

E-mail: nelida_marin@yahoo.com