سنتز شیمیایی فاز جامد Brevinin2R و دیاسترومر آن به عنوان پپتید ضد باکتریایی ومطالعه ساختار-فعالیت

هاشم یعقوبی[۱]، حسین نادری منش*[۱]، یداله امیدی[۲] و احمد آسوده[۳]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک- بیوشیمی

[۲] تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات نانو فناوری دارویی

[۳] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد،دانشکده علوم،گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۳

چکیده

ترشحات سطح پوست دوزیستان سرشار از ترکیبات مختلف است . برخی ترکیبات دارای عملکرد فیزیولوژیک و برخی دیگر که دارای فعالیت ضد میکروبی هستند بخشی از دفاع اولیه دوزیستان را تشکیل می دهند. در این تحقیق Brevinin-2R که حاوی ۲۵ آمینواسید برای اولین بار به صورت فاز جامد در ایران سنتز گردید. Brevinin-2R حاوی ۲۵ آمینواسید می‌باشدکه از پوست قورباغه *Rana ridibunda* ترشح می‌شود. این پپتید دارای خاصیت ضد باکتریایی بالقوه بوده وخاصیت همولیتیک ضعیفی دارد. ازلحاظ خصوصیات ساختاری این پپتید دارای انتهای آمینی آب دوست و انتهای کربوکسیل آن دارای لوپ است که توسط یک پیوند دی سولفیدی ایجاد شده است، این ساختار در گونه‌های *Rana* مشترک است. به منظور بررسی خصوصیات ساختاری، ضد باکتریایی، فعالیت همولیتیکی و پایداری پروتئولیتیکی آنالوگهای D(دیاسترومرهای D-leu) به صورت فاز جامد سنتز شد ودرستی توالی سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی جرمی تأیید گردید. مطالعات ساختاری نشان داد که ساختار مارپیچ α و هیدروفوبیسیته نقش بسیار مهمی را در فعالیت این پپتیدها ایفاء می‌کند. آنالوگ D هیچ‌گونه فعالیت همولیتیکی حتی تا غلظت ۴۰۰ µg/ml از خود نشان ندادند. در حالی که Brevinin-2R به صورت جزیی دارای خاصیت همولیتیک بود. فعالیت ضد باکتریایی(MIC) Brevinin-2R در مقایسه با آنالوگ D در هر دو باکتریهای گرم منفی وگرم مثبت بیشتر بود. فعالیت طیف CD در محیط آب و (۵۰ درصد)TFE تری فلوروواتانل نشان داد که این پپتیدها در محیط آب هیچ گونه ساختار مشخصی ندارند ولی در محیط TFE که مشابه ساختار غشاء می‌باشد به صورت مارپیچ آلفا در می آیند که در مورد Brevinin-2R درصد آلفا هلیکس نسبت به آنالوگ خود تفاوت فاحشی داشت. در مورد Brevinin-2R درصد آلفا هلیکس محاسبه شده ۵۳ درصد است. پایداری پروتئولیتیکی نشان داد که پپتیدBrevinin-2R در مقایسه با آنالوگ D به پروتئازها حساس است.

واژه های کلیدی: Brevinin2R، خاصیت ضد باکتریایی، وخاصیت همولیتیک، طیف CD، هیدروفوبیسیته، سنتز شیمیایی فاز جامد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۵۸- ۰۲۱پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

آنتی بیوتیکها از داروهایی هستند که بیشترین مصرف را میان بیماران دارند و مصرف بیش از اندازه داروهای آنتی بیوتیک به علت ایجاد مقاومت دارویی و عوارض جانبی می تواند سلامت فرد را در معرض خطر قرار دهد. به عبارت دیگر می توان گفت آنتی بیوتیکها تیغ دولبه ای هستند که مصرف صحیح آنها سبب کنترل عفونت و

Archive of SID
www.SID.ir

مصرف بی رویه و نادرست آنها منجر به ایجاد مقاومت دارویی خواهد شد (۲ و ۱۹). وقتی آنتی بیوتیکها برای نخستین بار در درمان بیماریهای عفونی موفق عمل کردند، بسیاری از محققان بر این باور بودند که انسان توانسته برای همیشه بر بیماریهای عفونی غلبه کند؛ اما پس از گذشت چندین دهه در نتیجه کاهش تأثیر آنتی بیوتیکها و ایجاد مقاومت دارویی، این گروه از داروها دیگر نتوانست سلامت انسانها را در برابر عوامل میکروبی تضمین کند (۵ و ۲۸).

در سالهای اخیر علاقه مندی محققان در زمینه تحقیق درباره حل مشکلات ناشی از مقاومت دارویی با استفاده از پپتیدها با افزایش چشمگیری داشته است. امروزه پپتیدهای ضدمیکروبی به خوبی شناخته شده اند. صدها نوع از این پپتیدها در موجودات زنده کشف شده اند و تعداد زیادی پپتید دارویی ضدمیکروبی نیز ساخته شده است. در چند دهه اخیر، جستجو برای داروهای جدید از پپتیدها ۱۰ تا ۴۰ اسیدآمینه ای مورد توجه قرار گرفته و تلاشهای زیادی در این زمینه از سوی محققان و داروسازان انجام شده است (۳ و ۵). بررسی توسعه تجاری پپتیدهای ضد میکروبی در کشورهای مختلف نشان می دهد که می توان از داروهای پپتیدی در مراحل مختلف درمان و برای درمان موارد مختلف ابتلا به عفونت مانند زخم پای بیماران دیابتی، جوش صورت، عفونت غشای مخاطی، ورم لثه یا منتژیت به صورت موضعی، خوراکی یا سیستمیک استفاده کرد (۱۵ و۲۰).

اگر چه چندین دهه از مطرح شدن پپتیدها به عنوان دارو می گذرد، اما عوامل مختلفی مانند هضم پپتیدها توسط آنزیمهای مختلف مانند پروتئازها، کندی سرعت انتقال این نوع داروها از غشاء و انعطاف پذیری بالای آنها محدودیتهایی را در استفاده از آنها به عنوان داروهای ضدباکتریایی به وجود آورده است که مانع گسترش مصرف آنها در میان بیماران می شود. داشتن نیمه عمر کوتاه و بالابودن هزینه فرموله کردن آنها در مقایسه با داروهای جدید نیز از دیگر معایب این گروه از داروهاست. علاوه بر این، پپتیدها ترکیباتی هیدرفیلیک یا آب دوست هستند و نمی توانند از مانع مغزی خونی عبور کنند(۹، ۱۱، ۱۶ و ۲۶). از سوی دیگر، بسیاری از محققان با توجه به اینکه پپتیدها از فعالیت زیستی بالایی برخوردار بوده و هزینه درمانی بسیار پایین تری را به بیمار تحمیل می کنند این ترکیبات را کاندیداهای خوبی برای سنتز داروها می دانند، همچنین یکی از مهم ترین مزایای پپتیدها به عنوان دارو این است که معمولاً چنین داروهایی عوارض جانبی نداشته و به علت داشتن سمیت پایین، مشکلاتی را برای بیمار به وجود نخواهند آورد. اما باید این نکته را مورد توجه قرار داد که استفاده از پپتیدها به عنوان دارو مستلزم ایجاد تغییراتی در این ترکیبات است تا از خواص دارویی مناسب مانند پایداری متابولیکی، تمایل بالا و اختصاصی بودن برای یک آنزیم یا گیرنده به خصوص برخوردار شوند(۲۱ و ۱۲).

اولین عضو خانواده بروینین - ۲(Brevinin-۲) اولین بار از ترشحات پوست نوعی قورباغه تالابی ژاپن *Rana brevipoda porsa* استخراج شد. پپتیدهای خانواده بروینین -۲ ، توزیع بسیارگسترده ای در دوزیستان جنس رانا در اروپا و آسیا دارد. تاکنون چهارده عضو خانواده بروینین – ۲ از ترشحات پوستی و معده*Rana esculenta* شناسایی شده است که با لحاظ کردن بروینین –۲Rبه پانزده عضو می رسد (۱ و ۱۳). بروینین –۲R از جنس *R.ridibunda* شباهت زیادی به بروینین -۲Ee گونه*R.esculenta* دارد. همچنین پپتید بروینین –۲R شباهت زیادی به بروینین -۲Ej دارد. (25) بروینین-R ۲ برای اولین بار توسط آسوده و همکاران (۲۳) از ترشحات پوستی قورباغه مردابی معمولی *Rana ridibunda*جدا گردید. محل پیدایش این گونه بیشتر در ساحل شمالی دریای خزر و روسیه است. این پپتید حاوی ۲۵ آمینواسید می‌باشد. ازلحاظ خصوصیات ساختاری این پپتید دارای انتهای آمینی آب دوست و انتهای کربوکسیل

Archive of SID

www.SID.ir

آن دارای لوپ است که توسط یک پیوند دی سولفیدی ایجاد شده است، این ساختار در گونه‌های Ranaمشترک است.

در این تحقیق از روش تغییر نوع اسید آمینه در بدنه اصلی پپتید استفاده شد. هدف تحقیق حاضر، سنتز و مطالعه فعالیت پپتیدهای بروینین-R ۲ و آنالوگ آن یعنی Sami-D که تمام اسید آمینه های لوسین (Leu) آن از نوع D است، و مطالعه فعالیت ضد میکروبی ، مطالعه ارتباط توالی- ساختار و بررسی عوامل مؤثر بر فعالیت پپتیدها است. هدف بلند مدت، تلاش برای پیدا کردن کلیدی برای طراحی منطقی پپتیدهای ضد میکروبی جدید دارویی می باشد. هدف نهایی تحقیق در این زمینه مهندسی پپتید با سمیت کمتر ، فعالیت ضد میکروبی بیشتر و مقاومت در برابر هضم پروتئازها است. همچنین تلاش برای ایجاد داروهای مؤثر بر علیه انواع بیماریها به ویژه سلولهای سرطانی است.

مواد و روشها

اسید آمینه های محافظت شده، رزین و همه واکنشگر های سنتزی از شرکت باخم (آلمان) خریداری شد. تمام مواد شیمیایی خلوص بیش از ۹۹ درصد داشتند. حلالهای شیمیایی برای HPLC وTFE از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. سوشهای گرم مثبت و منفی از پژوهشکده علمی – صنعتی گرفته شد.

سنتز شیمیایی پپتیدهای بروینین-R ۲ ، آنالوگ Sami-D و تخلیص: سنتز شیمیایی پپتیدهای بروینین-R ۲ و آنالوگ Sami-D با استفاده از رزین 2Cl-Trtcl و تکنیک FMOC انجام شد. در ابتدا FMOC-Cys(Trt) با استفاده از DIEPA در محیط DMF:DCM (1:1) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به هم زده شد تا به رزین متصل گردد. برای حذف گروه FMOC، ۱/۲۵ میلی لیتر پی پیریدین ۲۰ درصد (در DMF) به ظرف واکنش اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد. مقدار کمی از رزین توسط آزمایش نین هیدرین، برای اطمینان از حفاظت زدایی گروه محافظت کننده FMOC آزمایش نین هیدرین روی رزین انجام شد که رنگ آبی مؤید انجام واکنش بود. (اگر آبی شده باشد مثبت و اگر بیرنگ تا زرد باشد، منفی یعنی گروه FMOC از اسید آمینه جدا نشده است) . برای گام اتصال(کوپل کردن) که اضافه کردن اسید آمینه دوم به اول استTBTU و DIEPA به ظرف واکنش اضافه شد و به مدت ۲ ساعت تکان داده شد (آزمایش نین هیدرین انجام شد. رنگ زرد نشانگر انجام واکنش بود). به ترتیب برای اضافه کردن اسید آمینه بعدی سه مرحله اتصال، حذف گروه محافظت کننده و اتصال اسید آمینه بعدی و سپس آزمایش نین هیدرین برای هر گام انجام شد .

(در صورت لزوم این زمان می تواند طولانی تر باشد از اسید آمینه ده به بعد مدت زمان اتصال اسید آمینه به اسید آمینه بعدی ۴ ساعت شد).

برای مرحله شکست کامل و جدا کردن پپتید از ستون۲/۵ سی سی محلول ۹۵ درصد تری فلورو استیک اسید (TFA) ۲/۵ درصد آب و۲/۵ درصد TIS به آن افزوده شد و به مدت ۲ ساعت تکان داده شد رزین سیاه گردید. این بخش حتماً بایستی زیر هود انجام گیرد. سپس قطره قطره از دی اتیل اتر سرد (که قبلاً تقطیر شده بود) به آن اضافه شد که کم کم رسوب سفید رنگی تشکیل شد. بعد از مشاهده رسوب سفید رنگ فالکونها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس فالکونها به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و دی اتیل اتر از رسوب جدا گردید. نمونه برای جداسازی با HPLC آماده شد و با ستون C8 نیمه آماده سازو شیب ۱ درصد استونیتریل اولین جداسازی انجام شد.

نحوه تشکیل پیوند دی- سولفیدی: برای تشکیل پیوند دی -سولفیدی در ابتدا پپتیدها در غلظت پایین‌تر از ۲۰ mM بافر فسفات ۰/۰۱ M (pH 7) در حضور ۱۰ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

DMSO حل گردید (۲۹و۲۷) بعد در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز هم زده شد. در این مدت از نمونه در فواصل زمانی مختلف به منظور تشکیل پیوند دی- سولفیدی برداشته شد و توسط دستگاه HPLC بررسی گردید. بعد از خالص کردن نمونه ها به منظور اطمینان بیشتر از تشکیل پیوند دی- سولفیدی توسط Mass تأیید گردید.

تعیین حداقل غلظت مهاری(MIC) پپتیدها: تعیین (MIC) بر اساس روش کلاسیک توصیه شده کمیته ملی ایمن آزمایشگاهی و استاندارد (NCLSS) می شود که توسط Hancock با تغییراتی برای پپتیدهای کاتیونیک نیز استاندارد گردیده است (۱۸) .

از سویه های کشت داده شده در پلیتهای MHA به لوله های حاوی MHB ۵ میلی لیتر تلقیح انجام داده و به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه و تکان دادن با rpm ۱۸۰ انکوبه شد. پپتید مورد نظر در آب مقطر به میزان ۲۰ برابر غلظت مورد نیاز تهیه شد و در یک حجم از محلول اسیداستیک ۰/۱ درصد و BSA ۰/۲ درصد رقیق شد تا ۱۰ برابر غلظت ماکزیمم مورد نیاز تهیه گردید. باکتری کشت داده شده در MHB را رقیق نموده تا $2\text{-}7*10^{5}$ CFU/ml به دست آمد. (در این مرحله لوله های مک فارلند تهیه شد و مقایسه کدورت با این لوله ها انجام شد). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در هر چاهک از ستونهای ۱ الی ۱۱ منتقل شد. در ستون ۱۲، ۱۰۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه شد (لوله شاهد دستگاه الایزا). مقدار ۱۱ میکرولیتر از پپتید X 10 به هر چاهک ۱ الی ۱۱ اضافه شد (ستون ۱۱ کنترل باکتری به تنهایی و بدون پپتید بود). چاهکهای اطراف چاهکهای نمونه توسط آب مقطر استریلیزه پرشد. پلیتها در ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شد. جذب چاهکها با دستگاه الایزا خوانده شد. MIC پایین ترین غلظت پپتید است که بیش از ۵۰ درصد رشد را کاهش داده است.

سنجش همولیز پپتید: ۵ ml خون تازه انسان را در یک لوله هپارینه ریخته و در دورrpm ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ نموده و سپس گلبول های قرمز را با PBS شسته تا محلول رویی کاملاً شفاف شود و گلبولهای قرمز در ml ۲۰ PBS رقیق گردید.

۱۹۰µlاز سوسپانسیون سلولی را در لوله های میکروفیوز ریخته و µl ۱۰ نمونه پپتید که به صورت سریالی رقیق شده است (سریالهای x ۲۰) به آن اضافه گردید. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد پس از آن لوله ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید µl ۱۰۰ از محلول رویی را تا حجمml ۱ بافرPBS رقیق گردیده و جذب آن در nm ۵۶۷ قرائت شد. OD نسبی در مقایسه با سوسپانسیون سلولی که ۰/۲ درصد تریتون ۱۰۰ X- که معیار ۱۰۰ درصد همولیز است محاسبه گردید.(۱۷)

پایداری پروتئولیتیکی: یکی از مهارکننده های پپتید های ضد میکروبی، پروتئازها هستند. برای ارزیابی میزان حساسیت یا مقاومت و مهارکنندگی این پپتیدها، در حضور تریپسین استفاده شد. بروینین-R ۲ و آنالوگ Sami-D در PBS (pH7.4) حل گردید. پپتیدها، در حضور تریپسین به نسبت ۱:۲۵۰ (آنزیم / پپتید W/W) در ویالهای ۱.۵ml دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت، پس از این مدت زمان مهار فعالیت تریپسین با اضافه کردن مهار کننده تریپسین تیپ soybean (Sigma) II-S , در زمانهای مختلف انجام شد. سپس نمونه‌ها برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی باقیمانده مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴ و ۲۲).

طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی: طیف CD پپتیدها در 20 mmبافر سدیم فسفات و ۵۰ درصد تری فلورو اتانول (TFE) در بافر سدیم فسفات به کمک اسپکتو پلاریمتر مدلهای جاسکو مدل J-715 صورت پذیرفت. طیفها بر اساس پارامتر بیضی واری مولی ارائه شده است. این پارامتر از رابطه زیر محاسبه گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

$$[\theta]= \theta\times 100MRW/cl$$

C غلظت پپتید برحسب میلی گرم بر میلی لیتر، l طول مسیر نور برحسب سانتیمتر، θ بیضی واری مولی برحسب درجه در طول موج λ و MRW ، میانگین وزن هر مانده آمینو اسیدی است. پهنای باند ۲ نانومتر و سرعت اسکن ۱۰۰ نانومتر در دقیقه انتخاب شد. برای ثبت طیف پپتید به ترتیب از کووتهایی با طول ۱ و۱۰ میلی متر استفاده شد و در غلظت حدود ۲۰۰µg/ml از پپتیدها طیف سنجی انجام گرفت. پارازیتهای طیف به کمک نرم‌افزار جاسکو J-715 از بین رفت.

برای محاسبه درصد ساختار دوم پروتئین، طیفهای ناحیه دور دورنگ نمایی دورانی با استفاده از نرم افزار شرکت جاسکو (نسخه ۰۲-۱۰-۱) بررسی شده و در صد مارپیچ آلفا، صفحات β، خم β و شکل راندوم‌کویل تعیین گردید. همچنین در مواردی درصد مارپیچ آلفا با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\alpha\text{-Helix}(\%)=([\theta]_{222}+2340/-30300)\times 100$$

$[\theta]_{222}$ بیضی واری مولی در طول موج ۲۲۲ نانومتر می باشد. طیفها در ۲۵ درجه سانتی گراد از ۱۹۰ تا ۲۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. پپتیدهای لیوفیلیزه شده در آب دیونیزه حل شد و سه اسکن برای هر نمونه انجام و میانگین محاسبه گردید. مقادیر بیضی واری بر حسب میلی درجه به بیضی واری مولی تبدیل شد و بر اساس $deg.cm^2dmol^{-1}$ بیان شد (۶ و ۸). اندازه گیری غلظت پپتیدی با روش Waddlle انجام شد (۳۱) .

نتایج

سنتز: پپتیدها در شرایط آزمایشگاه و به صورت دستی در ستونهای شیشه ای دارای شیر سنتز شدند. پس از هر مرحله اتصال و جدا کردن محافظ، آزمایش نین هیدرین انجام شد. پس از طی چرخه کامل سنتز و اتمام مرحله آخر به کمک ۹۵ درصد تری فلورو استیک اسید (TFA) ۲/۵ درصد آب و۲/۵ درصد TIS به مدت ۲ ساعت که تکان داده شد، (رزین سیاه می شود و در ضمن این بخش حتماً بایستی زیر هود انجام گیرد) پپتیدها از رزین جدا شده و سپس قطره قطره از دی اتیل اتر سرد به آن اضافه تا کم کم رسوب سفید رنگی تشکیل شد.

پپتیدها به این ترتیب نامگذاری شدند:

برووینین-R ۲ KLKNFAKGVAQSLLNKAS<u>C</u>KLSGQ<u>C</u>

Sami-D(دیاسترومر)K**L**KNFAKGVAQS**LL**NKAS<u>C</u>K**L**SGQ<u>C</u>

تخلیص: ابتدا هر دو نمونه برای اولین بار با ستون C18 تجزیه‌ای با تزریق بسیار کم پپتید آزمایش شد و محل خروج نمونه که احتمالا" بزرگترین پیک است، تعیین گردید. بعد از آن هر نمونه با ستون C18 نیمه آماده ساز و شیب ۱ درصد با مقادیر بیشتر خالص شد اشکال (۱ و ۲) و در تمامی موارد با ستون C18 تجزیه‌ای خلوص بالای ۹۸ درصد تأیید شد.

زمان خروج و یا اصطلاحاً زمان باقیماندن بروینین-R ۲ طولانی‌تر از آنالوگ آن و Sami-D بود که نشان دهنده آب گریزتر بودن بروینین-R ۲ نسبت به آنالوگ است.

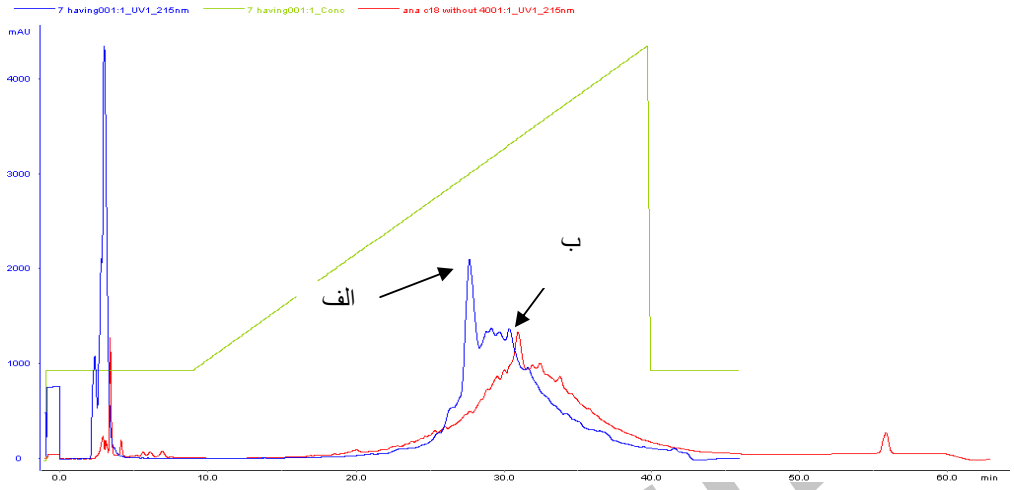
تعیین وزن مولکولی پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن با استفاده از طیف سنجی جرمی: تأیید نهایی وزن مولکولی پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن با استفاده از طیف سنجی جرمی در دانشگاه سنگاپور انجام شد.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی پپتید بروینین – R ۲ و آنالوگ آن علیه سوشهای استاندارد میکروبی: فعالیت میکروبی بروینین-R ۲ علیه باکتریهای گرم منفی وگرم مثبت به روش تعیین حداقل غلظت مهاری(MIC) تعیین گردید که در پلیت ۹۶ تایی انجام شد. در جدول -۱ قدرت ضد میکروبی این پپتید علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی آمده است. بروینین-R ۲ در محدوده MIC بین 0/39-12/5 µg/ml و Sami-D بین 0/75-100 µg/ml طیفی از باکتریها را از بین می برد. در این بین، باکتری *Staphylococcus*

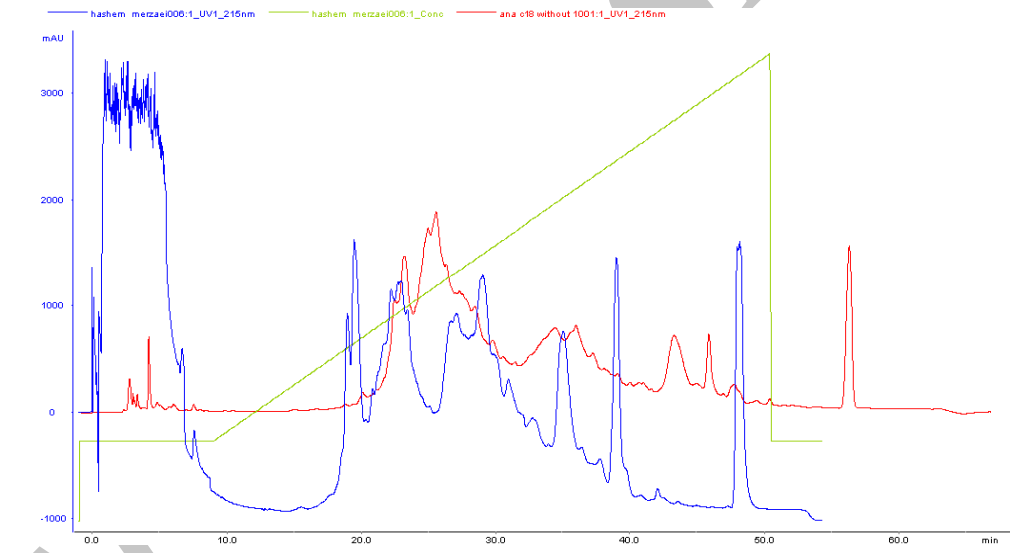
Archive of SID

www.SID.ir

epidermidis حساس‌ترین و *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم ترین باکتری در این جدول است.



شکل ۱- کروماتوگرام پپتید بروینین-R ۲ (الف) دارای پیوند دی- سولفیدی (ب) فاقد پیوند دی- سولفیدی



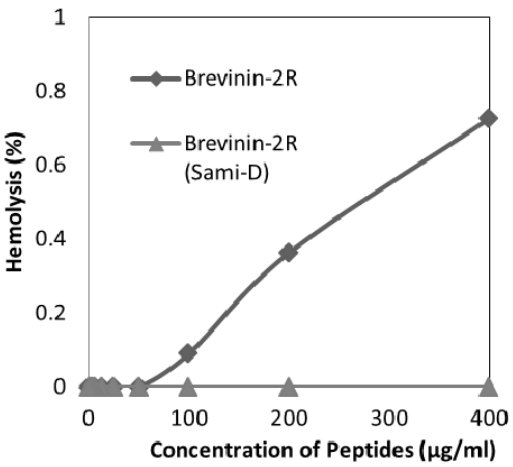
شکل ۲- کروماتوگرام پپتید (Sami-D) بروینین-R ۲ (الف) دارای پیوند دی- سولفیدی (ب) فاقد پیوند دی- سولفیدی

جدول ۱- مقادیر MIC بروینین-R ۲ وآنالوگهایش بر علیه سوش‌های استاندارد باکتریایی

Bacteria	Brevinin-2R	Sami-D
(*Methicillin resistant S. aureus*) MRSA	6.25	25
1015 (*Bacillus cereus*)	0.78	3.12
1112 (*Staphylococcus aureus*)	1.56	6.25
1114 (*Staphylococcus epidermidis*)	0.39	0.78
ATCC27853 (*Pseudomonas aeruginosa*)	25	100
ATCC13883 (*Klebsiella pneumonia*)	12.5	25
ATCC2592 (*Escherichia coli*)	0.39	12.5

www.SID.ir

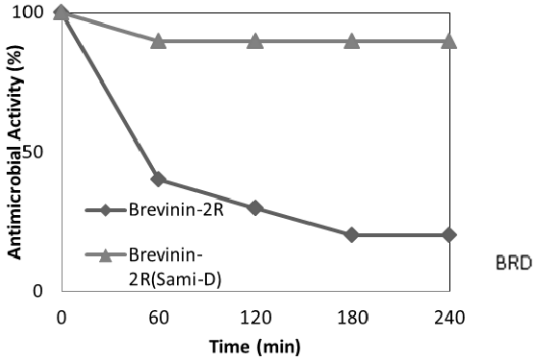
تعیین فعالیت همولیزی: فعالیت همولیزی در غلظتهای مختلف بروینین-R ۲ و آنالوگ آن علیه ارتیروسیت های انسان سنجیده شد. با اندازه گیری میزان جذب ۵۶۷ nm کنترل منفی PBS، کنترل مثبت ۰/۲ درصد تریتون X_{100} و نمونه های مختلف تیمار شده ، فعالیت نسبی همولیزی محاسبه گردید همان طور که در شکل ۳ آمده است. پپتید بروینین -R ۲ تا غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای ۰/۷درصد فعالیت همولیزی است که این مقدار در مقایسه با بسیاری از پپتیدها از جمله ملیتین ها بسیار پایین است، جالب این است که آنالوگ Sami-D حتی تا غلظت ۴۰۰ µg/ml هیچ گونه فعالیت همولیزی از خود نشان ندادند که این مقدار از محدوده MIC این پپتیدها خیلی زیاد است که یکی از ویژگیهای بسیار مطلوب این آنالوگهای طراحی شده محسوب می‌شود.



شکل ۳- بررسی فعالیت همولیزی در غلظتهای مختلف بروینین-R ۲ و آنالوگ آن علیه ارتیروسیت های انسان

پایداری در برابر هضم پروتئازها: یکی از مشکلات عمده در تمام پپتیدهای ضدمیکروبی هضم سریع آنها توسط پروتئازهای موجود در جریان خون و سلولها می باشد. این عامل می‌تواند یک مانع بزرگ برای استفاده از آنها به عنوان داروهای مؤثر باشد. پیوندهای پپتیدی به راحتی توسط پروتئازها شکسته می شوند. یک روش آسان برای افزایش پایداری پپتیدها حلقوی کردن و جایگزین کردن اسیدهای آمینه نوع D به جای L است.

شکل ۴ – فعالیت ضد باکتریایی باقیمانده بروینین-R ۲ و آنالوگ آن را بر روی باکتری گرم مثبت *Staphylococcus epidermidis* که به مدت ۴ ساعت در معرض تریپسین بوده و در زمانهای مختلف فعالیت ضد باکتریایی بررسی شده است را نشان می‌دهد.



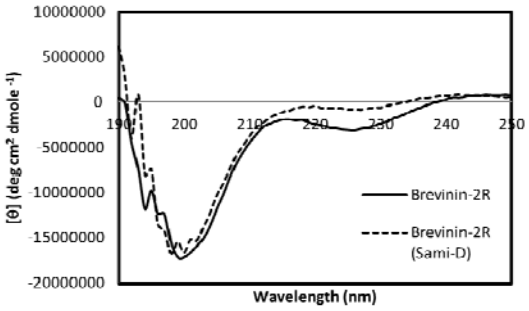
شکل ۴- بررسی میزان حساسیت پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن بر روی باکتری گرم مثبت

همان طوری که مشخص است، در مدت ۴ ساعت تغییر زیادی در فعالیت ضد باکتریایی آنالوگ Sami-Dصورت نگرفته است و ۹۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است ، پپتید بروینین-R ۲ در مقایسه با آنالوگ کاهش فعالیت چشمگیری از خود نشان می‌دهد که این مقدار ۲۰ درصد حالت اولیه است که نشان دهنده نقاط حساس زیاد به هضم تریپسین است.

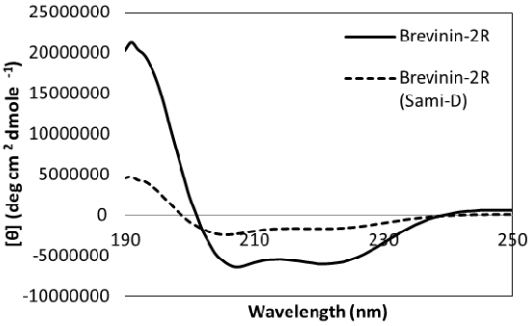
نتایج حاصل از طیف دورنگ نمایی دورانی: ساختار دوم پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن از طریق طیف سنجی CD در حضور و غیاب تری فلوئورو اتانول(TFE) محاسبه گردید. اشکال (۵ و ۶) طیف CD این پپتیدها در ۵۰Mm بافر سدیم فسفات و در محلول هیدرفوب ۵۰ درصد تری فلوئورو اتانول(TFE) که محیطی شبیه ساختار غشاء را به وجود می‌آورد، نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

همان‌طور که از اشکال دیده می‌شود همانند اکثر پپتیدهای ضدمیکروبی در محلولهای مایی هیچیک از پپتیدها ساختار منظم و خاصی ندارند و بیشتر به حالت راندوم کویل دیده می‌شوند، ولی در محیطهای هیدرفوب (مانند: SDS و TFE) دارای ساختار دوم مارپیچ- α هستند. در جدول – ۲ نیز مقادیر مختلف عددی ساختار دوم نشان داده شده است.



شکل ۵- طیف CD پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن در ۵۰Mm بافر سدیم فسفات



شکل ۶- طیف CD پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن در حضور تری فلوئورو اتانول(TFE)

جدول –۲ مقادیر مختلف عددی ساختار دوم پپتید بروینین-R ۲ و آنالوگ آن در غیاب و در حضور ۵۰ درصد TFE بین طول موج ۱۹۵–۲۶۰ nm

	H_2O		TFE (50%)	
	Brevinin-2R	**Sami-D**	**Brevinin-2R**	**Sami-D**
Helix	14/3	6/8	53/0	17/7
Antiparallel	18/9	20/7	2/7	19/6
Parallel	14/3	5/4	4/0	4/9
Beta-Turn	13/5	19/9	18/9	17/4
Rndm. Coil	40/7	47/8	21/9	40/8
Total Sum%	101/7	100/6	100/5	100/4

بحث و نتیجه‌گیری

پپتیدهای ضدمیکروبی نسبت به آنزیمها و آنتی بادیها و رسپتورهای هورمونی از ویژگی کمتری نسبت به هدف خود برخور دارند. مطالعات ساختار - عمل پپتیدهای ضد باکتری نشان داده است که ساختار آمفی پاتیک و بار خالص مثبت از عوامل اصلی فعالیت ضدمیکروبی به شمارمی رود. مشخصهٔ دیگر پپتید های ضد میکروبی در این است که هدف آنها غشاء باکتریهاست .پپتید های ضد میکروبی همانند درجنتها موجب بر هم ریختن غشای میکروبها می گردد .برهم کنشهای بار - بار بین عوامل مثبت پپتیدها با عوامل منفی غشاء در اتصال وتشکیل ساختار آمفی پاتیک ضروری است(۴) غشای باکتریها دارای عوامل با بار منفی همانند: LPS و LTA هستند از طرف دیگر دارای فسفاتیدیل گلیسرول و کاردیو لیپین است که بار منفی

Archive of SID
www.SID.ir

بیشتری از غشای سلولهای یوکاریوت دارد .غشای سلولهای یوکاریوت بیشتر دارای فسفاتیدیل کولین است(۷و۲۳) .

در این تحقیق پپتیدهای بروینین 2R و آنالوگ آن برای اولین بار در ایران که دارای ۲۵ اسیدآمینه می‌باشد از طریق فاز جامد سنتز گردید. تمام پپتیدهای ضدمیکروبی شناخته شده دارای دو خاصیت خیلی مهم هستند (۱۱، ۱۵، ۲۰ و ۲۶):

۱. دارا بودن بار مثبت بالا
۲. دارا بودن هیدروفوبیسیته بالا

در این تحقیق بدون اینکه بر روی بار تغییراتی ایجاد گردد تمام اسیدهای آمینه L–لوسین با D–لوسین در آنالوگ Sami-D جابجا گردید. این تغییرات ایجاد شده در ساختار همان گونه که در MIC خود را نشان داد تغییرات چشمگیری را بر روی فعالیت Sami-D نسبت به پپتید بر-وینین 2R داشت و نشان داد که فعالیتش بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی کاهش یافته است. دلیل این امر دلالت بر این موضوع دارد که در تمام پپتیدهای ضدمیکروبی شناخته شده یک حدآستانه بین بار مثبت و هیدرفوبیسیته وجود دارد که هر عاملی که باعث به هم خوردن این تعادل گردد موجب کاهش فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی می‌شود. غشای باکتریها در مقایسه با غشای سلولهای پستانداران دارای بار منفی زیاد است. بار مثبت این پپتیدها با بار منفی غشای باکتریها برهمکنش یونی–یونی انجام می‌دهد و در مرحله بعد این هیدروفوبیسیته است که نقش خود را ایفاء می‌کند و باعث نفوذ این پپتیدها به غشای دولایه لیپیدی باکتریها می‌شود. عواملی که باعث به هم خوردن این تعادل شود باعث کاهش فعالیت این پپتیدها می‌گردد که در این تحقیق در مورد پپتید Sami-D مشاهده شد که به دلیل دارا بودن اسیدآمینه نوع D هیدروفوبیسیته آن کاهش یافته است که این موضوع وقتی که نمونه‌ها از ستون HPLC خارج می‌شوند مشاهده می گردد که نمونه Sami-D نسبت به بروینین 2R سریع تر از ستون خارج می‌شود. همچنین ساختار دوم مارپیچ آلفای به دست آمده از CD در محیط TFA ۵۰ درصد نیز این موضوع را تأیید می‌کند که بروینین 2R در محیط شبه غشایی ساختار آلفا مارپیچ مناسب ایجاد می‌کند که این ساختار برای ورود به درون غشای باکتری مناسب است. در مورد بالا بودن همولیز بروینین 2R نسبت به Sami-D نیز می‌توان گفت که در غشای سلولهای پستانداران در مقایسه با باکتریها دارای بار خنثی می‌باشد. بنابراین در اینجا نیز هر پپتیدی که دارای هیدروفوبیسیته بیشتری باشد باعث لیز بیشتر سلولهای پستانداران می‌شود که در مورد بروینین 2R مشاهده گردید. همچنین به دلیل اینکه Sami-D دارای اسیدآمینه نوع D–لوسین در مقایسه با بروینین 2R می‌باشد در برابر هضم آنزیمی تریپسین مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد چون آنزیمهای طبیعی انسان قادر به هضم اسیدهای‌آمینه نوع D نیستند. نتایج نشان داد که دیاسترومر کردن باعث می‌شود که فعالیت پپتید کاهش یابد همچنین تحقیق نشان داد که عواملی که باعث پایداری پپتید می‌شود می‌تواند به کاهش فعالیت منجر شود (۲۴ و ۳۰).

منابع

۱- حسن شاهیان، م و امتیازی،گ. (۱۳۸۷). بررسی رابطه بین هیدروفوبیسیته سطح سلولی و تولید بیوسورفکتانت در باکتریهای تجزیه کننده نفت خام. مجله زیست شناسی ایران،۲۱(۱): ۳۶-۴۴

۲- عبدی عالی، ا. سادات نیک بین، و. فیص ابادی، م. غروی، س و فلاحی، ز. (۱۳۸۴). مطالعه پروفیل پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی در Pseudomonas aeruginosa بیمارستانی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۸ (۲): ۱۴۱-۱۵۰

3. Alizadeh, M. F., Knoop, F. C., Vaudry, H., Conlon, J. M., Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex, Peptides 2003; 24: 955–961.

Archive of SID
www.SID.ir

4. Borner, C. and Monney, L. (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? Cell Death Differ. 6, 497-507.

5. Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immunol. 13, 61–69.

6. Blondelle, S. E. and Houghten, R. A. (1992) Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. Biochemistry. 31, 12688–12694.

7. Conlon, J. M., Seidel, B. and Nielsen, P. F. (2004) An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog Rana dalmatina. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 137, 191-196.

8. Chen, Y. H., Yang, J. T. and Martinez, H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. Biochemistry. 11, 4120–4131.

9. Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L. and Huang, C. M. (1988) Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. FEBS Lett. 236, 462–468.

10. Duellman, W.and Trueb, L. (1994) Biology of Amphibians, the John Hopkins University Press, London.

11. Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. and Bienert, M. (1996) Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. Biochemistry. 35, 12612–12622.

12. Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., Macdonald, D. L., Beyermann, M. and Bienert, M. (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. FEBS Lett. 403, 208–212.

13. Ehrenstein, G. and Lecar, H. (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. Q Rev Biophys. 10, 1–34.

14. Kiyota, T., Lee, S. and Sugihara, G. (1996) Design and synthesis of amphiphilic α -helical model peptides with systematically varied hydrophobichydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. Biochemistry. 35, 13196–13204.

15. Kwon, M. Y., Hong, S. Y. and Lee, K. H. (1998) Structure-activity analysis of brevinin1E amide, an antimicrobial peptide from Rana esculenta. Biochim Biophys Acta. 1387, 239–248.

16. Kenji, S., Toshiyuki, S., Shiro, S., Tamio, M., Koji, Y., Nobuo, H. and Motoo, Y. (2003) Improvement of biological activity and proteolytic stability of peptides by coupling with a cyclic peptide. Bioorg Medicinal Chem Lett. 13, 2583–2586.

17. Maloy, W. L. and Kari, U. P. (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. Biopolymers. 37, 105–122.

18. Matsuzaki, K. (1999) why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta. 1462, 1–10.

19. Minn, I., Kim, H.S., Kim, S.C., Antimicrobial peptides derived from pepsinogens in the stomach of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, Biochim. Biophys. Acta 1998; 407: 31-39.

20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, ۴th ed. Approved standard M۷-A۴. 1997; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

21. Rich, T., Allen, R. L. and Wyllie, A. H. (2000) Defying death after DNA damage. Nature. 407, 777-783.

22. Richard, M. E. and Vogel, H. G. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim Biophys Acta. 1462, 11–28.

23. Saeid, G., Ahmad, A., Thomas, K., Andrew, J. H., Kamran, K., Tadeusz, J. K., Spencer, B. G., Evan, P. B., Hossein, N. M. and Marek, L. (2007) Brevinin-2R semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. J. Cellular Molecular Medicine. 12, 1005-1022.

24. Sofia, Z., Anna, I. K., Panorea, M., Maria, S. D., Contantinos, S., Constantin, D. and Eygenia, P. P. (2007) Design and synthesis of cationic Aib-containing antimicrobial peptides: conformational and biological studies. J Pept Sci. 13, 481–486.

25. Znong, L., Putnam, R. J., Jonhson, W. C. and Rao, A. G. (1995) Design and synthesis of amphipathic antimicrobial peptides. Int. J. Peptide Protein Res. 45, 337–347.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Sung, Y. H., Jong, E. O. and Keun, H. (1999) Effect of D-Amino Acid Substitution on the Stability, The Secondary Structure and the Activity of Membrane-Active Peptide. Biochemical Pharm. 58, 1775–1780.

27. Sadowski, D. K., Coy, J. F., Mier, W., Hug, H. and Los, M. (2002) Caspases – their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. Arch Immunol Ther Exp. 50, 19-34.

28. Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. Biochim Biophys Acta. 1462, 55–70.

29. Tam, J. P., Wu, C. R. and Liu W. W. (1991) Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide Scope and applications. J Am Chem Soc. 113, 6657–6662.

30. Vande, V. C., Cizeau, J. and Dubik, D. (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. Mol Cell Biol. 20, 5454-5468.

31. Waddell W.J., A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. J. Lab. Clin. Med 48 (1956) 311–314.

Solid phase chemical synthesis and structure- activity study of brevinin-2R and analogues as antimicrobial peptides

Yaghoubi H.[1], Naderi-Manesh H.[1], Omidi Y.[2] and Asoodeh A.[3]

[1] Biochemistry – Biophysics Dept., Faculty of Biology Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Research Centre for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of IRAN

[3] Chemistry Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of IRAN

Abstract

Brevinin-2R, consisting of 25 amino acid residues, from the skin of the frog *Rana ridibunda* has potent antimicrobial and low hemolytic activity. From a structural point of view, this peptide has an N-terminal hydrophilic region, and a C-terminal loop region delineated by an intra-disulfide bridge, which is a common structural feature of antimicrobial peptides from *Rana* species. To investigate the structural features for antimicrobial, hemolytic activity and proteolytic stability, analogues diastereomer Sami-D brevinin-2R were synthesized and characterized. Structure-activity relationship studies revealed the importance of the amphipathic *α*-helical conformation of the reported peptides in inducing antimicrobial effects. Analogues D shows lower antimicrobial activity than brevinin-2R and did not show any hemolytic activity up 400 µg/ml whereas the brevinin-2R show low hemolytic activity. Circular dichroism spectra and the retention time on the C18 reverse phase column revealed that the brevinin-2R formed an amphipathic loop which increased hydrophobicity and helped to induce the α-helical structure in the membrane-mimetic environment. The hemolytic activity of brevinin-2R and its analogs also correlated well with the retention time and the α-helicity.

Keywords: Brevinin-2R; Antimicrobial peptide; Secondary structure; Hemolytic activity

Archive of SID

www.SID.ir