بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم تحقیقات و فناوری
دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی مولکولی

شبیه سازی نحوه تشکیل نانوپورها توسط پپتیدهای ضدمیکروبی و ضدسرطان در غشاها

اساتید راهنما:

دکتر نادر چاپارزاده

دکتر فرامرز مهرنژاد

استاد مشاور:

دکتر علیرضا راستکار ابراهیم زاده

پژوهشگر:

راحله اقدمی

بهمن ۱۳۹۲

تبریز/ایران

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه
چکیده.....یک
فصل اول: مقدمه
۱-۱- پپتید های ضدمیکروبی.....۳
۱-۱-۱- مکانیسم عمل پپتید های ضدمیکروبی.....۳
۱-۱-۲- منشا انتخابیت سلولی توسط پپتید های ضدمیکروبی.....۶
۱-۱-۳- تفاوت غشاهای پروکاریوتی و یوکاریوتی.....۶
۱-۱-۴- پتانسیل آنتی بیوتیکی پپتید های ضدمیکروبی.....۷
۱-۱-۵- پتانسیل پپتیدهای ضدمیکروبی در درمان سرطان ۸
۱-۲- پپتید ضدمیکروبی طبیعی پارداکسین.....۸
۱-۲-۱- ویژگی های پپتید پارداکسین.....۹
۱-۲-۱-۱- توالی.....۹
۱-۲-۱-۲- ویژگی دوگانه دوستی.....۱۰
۱-۲-۲- ساختار دوم پپتید پارداکسین.....۱۱
۱-۲-۲-۱- ساختار دوم پپتید پارداکسین در محیط آبی.....۱۱
۱-۲-۲-۲- ساختار دوم پپتید پارداکسین در محیط غشایی.....۱۱
۱-۲-۳- جهت گیری پپتید پارداکسین نسبت به غشاهای فسفولیپیدی.....۱۲
۱-۲-۴- قابلیت های پپتید پارداکسین.....۱۳
۱-۲-۴-۱- فعالیت ضدسرطانی پارداکسین.....۱۴
۱-۲-۴-۱-۱- القا آپوپتوز در سلول های فیبوسارکوما توسط پارداکسین ۱۵
۱-۲-۵- برهمکنش پپتید پارداکسین با غشا ۱۶
۱-۲-۶- مکانیسم عمل فعالیت ضدمیکروبی.....۱۷
۱-۳- مطالعات نظری.....۱۸
۱-۳-۱- شبیه سازی پپتید های غشایی.....۱۸
۱-۳-۲- شبیه سازی فسفولیپید ها.....۱۹
۱-۴- میدان نیرو.....۲۰
۱-۴-۱- مدل دانه درشت.....۲۱
۱-۴-۲- دلایل سرعت بالای دانه درشت.....۲۲
۱-۴-۳- مدل های پروتئینی دانه درشت.....۲۳
۱-۴-۴- دینامیک ها در شبیه سازی های دانه درشت.....۲۴

۱-۵- غشا های سلولی مدل..... ۲۵
فصل دوم: روش ها
۲-۱- مقدمه ای بر شبیه سازی های کامپیوتری..... ۲۸
۲-۲- طراحی شبیه سازی..... ۳۱
۲-۲-۱- انتخاب و دستیابی به ساختار اولیه..... ۳۱
۲-۲-۱-۱- ساختار اولیه پپتید..... ۳۱
۲-۲-۱-۲- ساختار اولیه دولایه های لیپیدی..... ۳۲
۲-۲-۲- آماده سازی فایل اولیه ی شبیه سازی..... ۳۲
۲-۲-۲-۱- آماده سازی پپتید..... ۳۲
۲-۲-۲-۲- آماده سازی غشا..... ۳۲
۲-۲-۲-۳- آماده سازی سیستم ترکیبی پپتید- غشا..... ۳۳
۲-۲-۳- افزودن یون وخنثی سازی سیستم..... ۳۴
۲-۲-۴- کمینه سازی انرژی..... ۳۴
۲-۲-۵- متعادل کردن محدودیت مکانی سیستم شبیه سازی..... ۳۴
۲-۲-۵-۱- هنگرد NVT..... ۳۵
۲-۲-۵-۲- هنگرد NPT..... ۳۵
۲-۲-۶- اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی..... ۳۵
۲-۳- روشهای تجزیه و تحلیل داده ها..... ۴۷
۲-۳-۱ جذر میانگین مربع تغییرات در ساختار..... ۴۷
۲-۳-۲ جذر میانگین مربع نوسانات در ساختار..... ۴۷
۲-۳-۳- بررسی ساختار مارپیچی..... ۴۸
۲-۳-۴- پیوند هیدروژنی..... ۴۸
۲-۳-۵- نظم زنجیره های هیدروکربنی غشا (order)..... ۴۹
۲-۳-۶- تابع توزیع شعاعی (RDF)..... ۴۹
فصل سوم: نتایج
۳-۱- نتایج بخش اول..... ۵۱
۳-۱-۱- دینامیک و ساختار..... ۵۲
۳-۱-۲- پیوند هیدروژنی..... ۵۸
۳-۱-۳- ورود پپتید پارداکسین به درون غشا..... ۶۰
۳-۱-۳-۱- فاصله بین چارچوب پپتید پارداکسین و گروه های سر فسفولیپیدی..... ۶۰
۳-۱-۳-۲- چگالی..... ۶۲
۳-۱-۴- تاثیر پارداکسین بر روی ساختار غشا..... ۶۳

۳-۱-۴-۱- نظم زنجیره های هیدروکربنی غشا (order)..... ۶۳
۳-۲- نتایج بخش دوم..... ۶۴
۳-۲-۱- دینامیک و ساختار..... ۶۴
۳-۲-۲- پیوند هیدروژنی..... ۷۰
۳-۲-۳- ورود پپتید پارداکسین به درون غشا..... ۷۲
۳-۲-۳-۱- فاصله بین چارچوب پپتید پارداکسین و گروه های سر فسفولیپیدی..... ۷۲
۳-۲-۳-۲- چگالی..... ۷۴
۳-۲-۴- تاثیر پارداکسین بر روی ساختار غشا..... ۷۵
۳-۲-۴-۱- نظم زنجیره های هیدروکربنی غشا (order)..... ۷۵
۳-۳- نتایج بخش سوم..... ۷۷
۳-۳-۱- ورود پپتید پارداکسین به درون غشا..... ۷۷
۳-۳-۱-۱- فاصله بین چارچوب پپتید پارداکسین و گروه های سر فسفولیپیدی..... ۷۷
۳-۳-۱-۲- چگالی..... ۷۹
فصل چهارم: تفسیر و پیشنهادات
۴-۱- تفسیر..... ۸۳
۴-۱-۱- تفسیر نتایج بخش‌های اول و دوم..... ۸۳
۴-۱-۲- تفسیر نتایج بخش سوم..... ۸۶
۴-۲- پیشنهادات..... ۸۷
منابع..... ۸۸
چکیده (انگلیسی)

فهرست شکل ها

عنوان.....صفحه
شکل ۱- ۱ مدل های تخریب غشا با AMPs ۵
شکل ۱-۲ توزیع باقیمانده های پپتید پارداکسین بوسیله ی چرخ مارپیچ.....۹
شکل ۱-۳ ساختار پارداکسین نشان دهنده ی رزیدوهای آبگریز (ارغوانی) و رزیدوهای آبدوست (سبز).....۱۰
شکل ۱-۴ ساختار پپتید پارداکسین در محلول های میسلی DPC.....۱۲
شکل ۱-۵ جهت گیری پپتید پارداکسین نسبت به غشاهای مختلف.....۱۳
شکل ۱-۶ طرح شماتیک آبشار پیام رسانی بیان ژن مربوط به آپوپتوز، القا شده توسط پارداکسین.....۱۶
شکل ۱-۷ سطوح متفاوتی از مدل سازی.....۲۱
شکل ۱-۸ مدل های دانه درشت ۲۰ آمینواسید پروتئین.....۲۴
شکل ۲-۱ تصویری از سیستم ترکیبی پپتید- لیپید POPC با حذف مولکول های آب پس از مرحله ی آماده سازی.....۴۴
شکل ۲-۲ تصویر جانبی از سیستم ترکیبی پپتید- لیپید DPPC و DMPC با حذف مولکول های آب پس از مرحله ی آماده سازی.....۴۵
شکل ۲-۳ تصویر جانبی از سیستم ترکیبی پپتید- لیپید DPPC با حذف مولکول های آب پس از مرحله ی آماده سازی با استفاده از شبیه سازی دانه درشت.....۴۶
شکل۲-۴ معیارهای ژئومتری.....۴۸
شکل ۳-۱ جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD).....۵۴
شکل ۳-۲ جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF).....۵۵
شکل ۳-۳- پروفایل ساختار دوم پپتید های پارداکسین در غشای DMPC در طول زمان شبیه سازی.....۵۶
شکل ۳-۴ پروفایل ساختار دوم پپتید های پارداکسین در غشای POPC در طول زمان شبیه سازی.....۵۷
شکل ۳-۵ تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید – پپتید، پپتید – آب و پپتید – لیپید در طول زمان شبیه سازی برای هر دوسیستم DMPC.....۵۹
شکل ۳-۶ تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید – پپتید، پپتید – آب و پپتید – لیپید در طول زمان شبیه سازی برای هر دوسیستم POPC.....۶۰
شکل ۳-۷ فاصله بین مرکز جرم چارچوب پپتید پارداکسین با مرکز جرم اتم های فسفر گروه های سر فسفولیپیدی در طول زمان شبیه سازی.....۶۱
شکل ۳-۸ دانسیته ی اجزای مختلف درون جعبه ی شبیه سازی.....۶۲
شکل ۳-۹ پارامتر نظم زنجیره های هیدروکربنی دولایه ی لیپیدی در سیستم های دولایه های لیپیدی خالص DMPC و POPC و همچنین دولایه های لیپیدی DMPC و POPC در حضور پپتید.....۶۳
شکل ۳-۱۰ جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD).....۶۶
شکل ۳-۱۱ جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF).....۶۷
شکل ۳-۱۲ پروفایل ساختار دوم پپتید های پارداکسین در غشای DPPC در طول زمان شبیه سازی.....۶۸

شکل ۳-۱۳ پروفایل ساختار دوم پپتید های پارداکسین در غشای POPC در طول زمان شبیه سازی..... ۶۹
شکل ۳-۱۴ تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید – پپتید، پپتید – آب و پپتید – لیپید در طول زمان شبیه سازی برای هر دو سیستم DPPC..... ۷۱
شکل ۳-۱۵ تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید – پپتید، پپتید – آب و پپتید – لیپید در طول زمان شبیه سازی برای هر دو سیستم POPC..... ۷۲
شکل ۳-۱۶ فاصله بین مرکز جرم چارچوب پپتید پارداکسین با مرکز جرم اتم های فسفر گروه های سر فسفولیپیدی در طول زمان شبیه سازی..... ۷۳
شکل ۳-۱۷ دانسیته ی اجزای مختلف درون جعبه ی شبیه سازی..... ۷۴
شکل ۳-۱۸ پارامتر نظم زنجیره های هیدروکربنی دولایه ی لیپیدی در سیستم های دولایه های لیپیدی خالص DPPC و POPC و همچنین دولایه های لیپیدی DPPC و POPC در حضور پپتید..... ۷۶
شکل ۳-۱۹ فاصله بین مرکز جرم چارچوب پپتید پارداکسین با مرکز جرم اتم های فسفر گروه های سر فسفولیپیدی در طول زمان شبیه سازی..... ۷۹
شکل ۳-۲۰ دانسیته ی اجزای مختلف درون جعبه ی شبیه سازی..... ۸۰
شکل ۳-۲۱ تصویری از منفذ ایجاد شده از سیتم ترکیبی پپتید- لیپید DPPC با شبیه سازی دانه درشت..... ۸۱

فهرست جدول ها

عنوان.....صفحه
جدول ۲-۱ فایل em.mdp مورد نیا ز برای مرحله ی کمینه سازی.....۳۶
جدول ۲-۲ فایل nvt.mdp مورد نیاز برای فاز اول متعادل سازی.....۳۷
جدول ۲-۳ فایل npt.mdp مورد نیاز برای فاز دوم متعادل سازی.....۳۸
جدول ۲-۴ فایل md.mdp مورد نیاز برای مرحله ی اجرای شبیه سازی AA-MD.....۳۹
جدول ۲-۵ فایل em.mdp مورد نیاز برای مرحله ی کمینه سازی.....۴۰
جدول۲-۶ فایل nvt.mdp مورد نیاز برای مرحله ی اول متعادل سازی.....۴۱
جدول ۲-۷ فایل npt.mdp مورد نیاز برای مرحله ی دوم متعادل سازی.....۴۲
جدول ۲-۸ فایل md.mdp مورد نیاز برای اجرای شبیه سازی CG-MD.....۴۳

چکیده

امروزه با وجود پیشرفت های زیاد در درمان سرطان، به دلیل ایجاد سلول های سرطانی مقاوم به دارو های ضدسرطانی موجود علاقه زیادی به توسعه دارو های ضدسرطانی با مکانیسم عمل جدید وجود دارد. مطالعات نشان داده که بعضی از این پپتید های ضدمیکروبی کاتیونیک نسبت به سلول های باکتریایی سمی ولی نسبت به سلول های طبیعی پستانداران سمی نیستند و طیف وسیعی از فعالیت های سیتوتوکسیک نسبت به سلول های سرطانی نشان می دهند. پارداکسین پپتید تخریب کننده ی غشایی که به صورت اصلی در ماهی *Pardachirus marmoratus* وجود دارد. شبیه سازی دینامیک های مولکولی پپتید پارداکسین آشکار کرد که جهت گیری مارپیچ C ترمینال این پپتید به ترکیب غشا بستگی دارد. آن در سطح دولایه ای های لیپیدی تشکیل شده از پالمیتوئیل- الئویل- فسفاتیدیل کولین (POPC) و درون دولایه ای های لیپیدی متشکل از دی مریستویل- فسفاتیدیل کولین (DMPC) قرار می گیرد. پپتید برای تخریب و فروپاشی غشا در غشاهای POPC با مکانیسم فرش و در غشاهای DMPC با مکانیسم تشکیل منفذ استوانه ای عمل می کند. روی هم رفته این نتایج نشان می دهد که مکانیسم پارداکسین بستگی به ترکیب غشا دارد.

کلمات کلیدی: پپتید ضدمیکروبی، دارو های ضدسرطانی، Pardaxin، شبیه سازی دینامیک های مولکولی

فصل اول:

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای ضدباکتریایی هستند که بدون آسیب به سلول میزبان یوکاریوتی مانع رشد یا زنده ماندن میکروب‌ها می‌شوند. کشت، توسعه و استفاده‌ی کلینیکی از آنتی بیوتیک‌ها از چشمگیرترین پیشرفت‌های پزشکی قرن بیستم است. اغلب آنتی بیوتیک‌ها، شامل پنیسیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، استروپتومایسسن‌ها و ... در یک دوره‌ی زمانی نسبتا کوتاه توسعه پیدا کرده اند. عمده‌ی داروهای ضد باکتریایی به یکی از سه طریق عمل می کنند: جلوگیری از بیوسنتز دیواره‌ی سلولی باکتری، جلوگیری از سنتز پروتئین‌های باکتری یا اختلال در همانندسازی و تعمیر DNA باکتری. در هر یک از این سه روش، آنتی بیوتیک‌ها به طور انتخابی از تفاوت‌های بیوشیمیایی بین سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی استفاده می کنند. آنتی بیوتیک‌های موثر از لحاظ کلینیکی پس از دوره‌ی چند ماهه یا چند ساله تمایل به ایجاد مقاومت در باکتری‌ها دارند. باکتری‌های مقاوم با سه نوع راهکار در مقابل آنتی بیوتیک‌ها مقاومت پیدا می کنند: پمپ آنتی بیوتیک‌ها به بیرون، تخریب مولکول آنتی بیوتیک و مخفی کردن ساختار هدف. با افزایش چشمگیر در تعداد باکتری‌های مقاوم به چند دارویی[1] علاقه به توسعه‌ی آنتی بیوتیک‌های جدید برای درمان‌های انسانی افزایش پیدا کرده است. پپتیدهای ضد میکروبی بخش اصلی سیستم ایمنی ذاتی است که در اغلب موجودات زنده توسعه پیدا می‌کنند، به طوری که این پپتیدهای کوچک کاتیونی طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پارازیت‌ها دارند. نحوه‌ی عملشان ممکن است با نفوذپذیر کردن غشاهای زیستی همراه باشد. پپتید های ضدمیکروبی (AMPs)[2] رده جدیدی از داروهای با پتانسیل آنتی بیوتیکی هستند. میانکنش این پپتیدها با غشاها ماهیت بیوفیزیکی دارد به طوری که احتمالا باعث می شود ایجاد مقاومت علیه پپتیدهای ضدمیکروبی مشکل باشد. به علاوه پپتیدهای ضد میکروبی خیلی سریع عمل می کنند و از این رو این پپتیدها کاندیدای مناسبی برای اهداف درمانی هستند [۱ و ۲].

[1] Multi-drug
[2] Antimicrobial Peptides

۱-۱- پپتیدهای ضدمیکروبی

بسیاری از موجودات زنده می‌توانند پپتیدهای کوچک، کاتیونی و دوگانه دوست[1] تولید کنند، که نقش‌های مهمی در مکانیسم دفاعی میزبان علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، ویروس‌های پوشش دار و سلول‌های سرطانی ایفا می کنند. پپتیدهای ضدمیکروبی در همه‌ی موجودات از مهره داران و گیاهان گرفته تا انسان یافت می شوند. از جمله ی این پپتیدها می توان به آلامتیسین[2]، سکروپین[3]، ماگاینین[4]، ملیتین[5]، ماکولاتین[6]، پروتگرین[7]، درماسپتین-ب[8] و ... اشاره کرد [۳-۱۳].

۱-۱-۱- مکانیسم عمل پپتیدهای ضدمیکروبی

عمده‌ی هدف پپتیدهای ضدمیکروبی غشاهای سلولی است که یکپارچگی فیزیکی دولایه‌های لیپیدی را تخریب می‌کنند. پپتیدهای ضدمیکروبی کوچک به سطح غشا متصل می شوند و زمانی که نسبت پپتید به لیپید از یک حد آستانه‌ی خاص بیشتر شد بسیاری از این پپتیدها منفذ تشکیل می‌دهند. منفذهای القا شده توسط این پپتیدها شیب الکتروشیمیایی عرض غشا را تخریب می‌کنند، در نتیجه باعث اسمولیز، تورم و در نهایت مرگ سلولی می شوند. چهار مرحله در فرآیند تشکیل منفذ[9] تشخیص داده می‌شود [۳،۱۲و۱۳].

مرحله‌ی اول: اتصال به غشا

پپتیدها که در ابتدا به صورت تصادفی و بدون ساختار در محلول قرار دارند به سرعت به سمت غشا حرکت و به سطح غشا (سطح برخورد[10] آب و غشا) متصل شده و به صورت آلفا هلیکس‌های دوگانه دوست پیچ می خورند. به محض اتصال به غشا، پپتیدها می‌چرخند، چنان که زنجیره‌های جانبی پپتید در C- ترمینال با گروه

[1] Amphiphilic
[2] Alamethicin
[3] Cecropin
[4] Magainin
[5] Melittin
[6] Maculatin
[7] Protegrin
[8] Dermaceptin-B
[9] Pore formation
[10] Interface

های فسفات میانکنش داده و N- ترمینال آبگریز[1] پپتید هم با مرکز هیدروفوبیک غشا هم با پپتید پارداکسین دیگر میانکنش می‌دهد.

مرحله‌ی دوم: تجمع[2]

تشکیل منفذ فقط زمانی می‌تواند مشاهده شود که پپتیدهای بیشتری تجمع پیدا کنند. این تجمع در فاز آبی و یا پس از اینکه پپتیدها به مرز غشا رسیدند می‌تواند اتفاق بیفتد.

مرحله‌ی سوم: جاسازی[3]

پپتیدها پس از تجمع پیدا کردن، شروع به جاسازی عمیق‌تر درون غشا می‌کنند. به نظر می رسد یک فرآیند تعاونی[4] در نتیجه‌ی میانکنش توده‌ی پپتید[5] با گروه‌های سر لیپیدی[6] باشد. ظاهرا میانکنش‌های الکترواستاتیک[7] الکترواستاتیک[7] در هدایت این فرآیند خیلی مهم است.

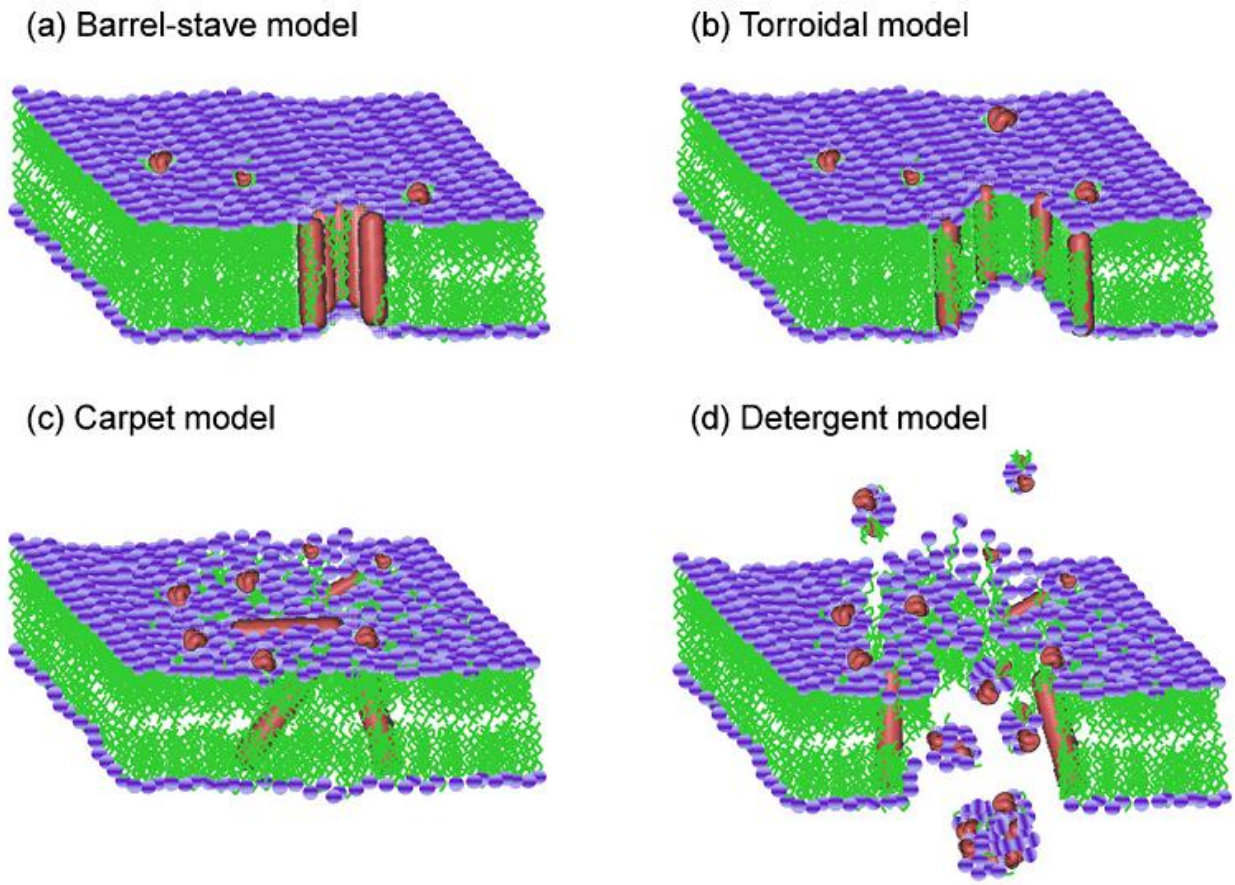
مرحله‌ی چهارم: تشکیل منفذ

مرحله‌ی نهایی زمانی اتفاق می‌افتد که یکی از پپتیدهایی که به طور عمیق جاسازی شده با سطح دیگر غشا در ارتباط باشد. یک منفذ آب تشکیل می‌شود و یک یا چند پپتید همراه با بعضی ملکول‌های لیپید در عرض غشا حرکت می‌کنند که باعث می‌شود نوعی از منفذ به نام Toroidal منفذ تشکیل شود.

بسته به نسبت پپتید به لیپید AMPs به سطح غشا متصل می‌شوند یا در نسبت‌های بالاتر داخل غشا می‌شوند، تشکیل منافذی را می‌دهند که غشا را دیونیزه می‌کند. از نظر ساختاری منافذ دو نوع هستند: در نوع استوانه‌ای (Barrel-stave Pores) پپتیدها در عرض غشا با یک ساختار بسیار منظم و در تماس مستقیم با یکدیگر طوری آرایش پیدا می‌کنند که یک منفذ آب استوانه‌ای تشکیل شود. در نوع حلقوی (Torroidal Pores) با حضور پپتیدها در عرض غشا آن‌ها طوری خم می‌شوند که گروه‌های سری نیم برگ بالایی و پایینی به هم متصل می-گردند. بدین ترتیب یک منفذ آب مرکزی به وسیله‌ی پپتیدها و گروه‌های سر لیپیدی آرایش پیدا می کند. در مکانیسمی دیگر این پپتیدها در یک حالت موازی با سطح سلول‌های میکروبی میانکنش می‌دهند و با تشکیل

[1] Hydrophobic
[2] Aggreagation
[3] Embedding
[4] cooperative process
[5] Peptide aggregate
[6] lipid head-groups
[7] Electrostatic

یک فرش در سطح دولایه‌ای از هم پاشیدگی غشا را القا می‌کنند. مطابق با این مدل، که مدل فرش نامیده می-شود، منافذی با اندازه‌ای بیش از ۱۰ نانومتر بر روی غشای باکتریایی ایجاد می‌شود. علاوه بر مدل فرش مدل شوینده نیز مکانیسم ضدمیکروبی مشابهی را دارد که در آن AMPs فروریختگی عظیمی از یکپارچگی غشا را القا می‌کنند [۲،۶،۱۲و۱۴].



شکل ۱- ۱ مدل‌های تخریب غشا با AMPs [۶].

۱-۱-۲- منشا انتخاب پذیری سلولی توسط پپتیدهای ضدمیکروبی

پپتیدهای ضدمیکروبی به طور انتخابی میکروارگانیسم‌ها را برای حفاظت میزبان مورد هدف قرار می‌دهند. مکانیسم عمل شان هنوز خوب شناخته شده نیست اما آن‌ها با لیپیدها میانکنش می‌دهند و تصور می‌شود اجزای لیپیدی غشای سلولی باکتریایی را هدف قرار می‌دهند که منجر به تخریب غشا می‌شود. اگرچه منشا انتخاب گری سلولی و مکانیسم عملشان هنوز خوب شناخته نشده است، اما تفاوت‌های میان ترکیب لیپیدی نیم برگ خارجی غشاهای پروکاریوتی و یوکاریوتی[1] منجر به تفاوت در مستعد بودن سلول‌ها نسبت به AMPs می‌شود و حتی ممکن است نحوه‌ی عمل این پپتیدها را تحت تاثیر قرار دهد. غشاهای پروکاریوتی که لیپیدهای آنیونیک دارند اغلب توسط پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی مورد هدف قرار می‌گیرند. با این حال به نظر می‌رسد فاکتورهای دیگر در کنار الکتروستاتیک‌ها ایفای نقش می‌کند [۲و۴].

۱-۱-۳- تفاوت غشاهای پروکاریوتی و یوکاریوتی

در کل غشاهای دولایه‌ای زیستی از اجزای فسفولیپیدی همچون فسفاتیدیل کولین[2] (PC)، فسفاتیدیل اتانول آمین[3] (PE)، فسفاتیدیل سرین[4] (PS)، فسفاتیدیل گلیسرول[5] (PG) و اسفنگومیلین[6] (SM) ساخته شده‌اند. به به دلیل تفاوت در ویژگی‌های بیوشیمیایی‌شان در pH فیزیولوژیکی فقط فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل گلیسرول بار منفی دارند در حالی که بقیه، گونه‌های خنثی[7] را تشکیل می-دهند [۲،۴،۶ و۱۵]. غشاهای پلاسمایی در سلول‌های پستانداران و میکروبی هم از لحاظ ترکیب و هم ساختار باهم تفاوت دارند. در سلول های پستانداران نیم برگ خارجی غشا اغلب از اسفنگومیلین و فسفاتیدیل کولین ساخته شده، عامل منزوی کننده بار منفی اسفنگومیلین درون نیم برگ داخلی دولایه‌ی فسفولیپیدی می‌باشد. در مقابل اسفنگومیلین در لایه ی خارجی اغلب غشاهای پلاسمایی میکروبی زیاد یافت می‌شود و این غشاها همچنین شامل لیپید آنیونی

[1] Prokaryotic and Eukaryotic membranes
[2] Phosphatidyl Choline
[3] Phosphatidyl Ethanolamine
[4] Phosphatidyl Serine
[5] Phosphatidyl Glycerol
[6] Sphingomyelin
[7] Zwiterionic

کاردیولیپین[1] و فسفولیپیدهایی با گروه سر آنیونی[2] فسفاتیدیل گلیسرول و یا گروه سر خنثی[3] فسفاتیدیل اتانول است. این به عنوان پایه‌ای برای انتخاب گری عوامل ضدمیکروبی فعال کننده ی غشا[4] به کار می‌رود. تحقیقات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که پپتیدهای ضدمیکروبی اغلب اتصالات قوی با فسفاتیدیل اتانول و اتصالات خیلی قوی‌تری با لیپیدهای آنیونیک دارند اما میانکنش‌های ناچیزی با لیپیدهای فسفاتیدیل کولین دارند [۶].

۱-۱-۴- پتانسیل آنتی بیوتیکی پپتیدهای ضدمیکروبی

بعد از کشف پنی سیلین[5] در ۱۹۲۸، آنتی بیوتیک‌ها نقش مهمی در زمینه ی مراقبت‌های بهداشتی و پزشکی ایفا می کنند. به دنبال این کشف، مواد بسیاری شناسایی شدند که با حمله به مسیرهای بیوسنتزی میکروبی مانع بیماری زایی[6] میکروب ها می شوند. با این حال جهش‌هایی که در میکروب‌ها رخ می دهد، معمولا با تجمع ژن ژن های مقاوم به دارو درون پلاسمیدهایشان باعث مقاومت چند دارویی[7] در باکتری‌ها می شود. با استفاده‌ی زیاد از این مواد، میکروب‌ها قادرند تا این ترکیبات را تغییر دهند که منجر به ظهور میکروب‌های مقاوم به چند دارویی[8] شده و امروزه یک چالش[9] جدید در درمان بیماری های واگیر دار است [۲،۴و۱۵]. واضح است که نیاز نیاز مبرمی به عوامل ضدمیکروبی جدید وجود دارد که به آسانی مستعد مقاوم شدن نیستند. از آن جایی که پپتید های ضدمیکروبی غشاهای سلولی را به طور مستقیم مورد هدف قرار می‌دهند، بنابراین احتمال کمتری برای توسعه ی مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آن ها وجود دارد، به همین دلیل این پپتیدها به عنوان الگوهایی برای ایجاد داروهای ضدباکتریایی جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند. برای طراحی این داروها لازم است جزئیات ملکولی درگیر در روش‌های عمل پپتیدهای ضدمیکروبی طبیعی دانسته شود [۶].

[1] Cardiolipin
[2] Anionic headgroup
[3] Zwitteronic headgroup
[4] Membrane-active antimicrobials agent
[5] Penicillin
[6] Virulence
[7] Multidrug
[8] Multidrug resistant microbes
[9] Challenge

۱-۱-۵- پتانسیل پپتیدهای ضدمیکروبی در درمان سرطان

اگرچه داروهای شیمی درمانی نقش مهمی را در درمان بسیاری از سرطان‌ها ایفا می‌کنند، استفاده از این عوامل ضد سرطانی با عوارضی همراه است. از آن جایی که عوامل شیمی درمانی هم سلول‌های سالم در حال تقسیم و هم سلول‌هایی که به طور غیر عادی در حال تقسیم اند را مورد هدف قرار می‌دهد عوارض جانبی نیز دارند. در چند سال گذشته با توجه به پتانسیل درمانی پپتیدهای ضدمیکروبی، مشخص شده این پپتیدها می توانند به عنوان یک گروه جدید از عوامل شیمی درمانی در جهت مبارزه با تومورهای مقاوم به دارو نقش امیدوار کننده ای را ایفا کنند [۱۶و۱۷].

تفاوت‌های اساسی بین غشای سلول‌های سرطانی و سالم دلیلی بر انتخابیت AMPs برای از بین بردن سلول های سرطانی می باشد. غشای پلاسمایی سلول‌های سرطانی از PS آنیونی و پروتئین‌های o-گلیکوزیله شده تشکیل شده اند. اعتقاد بر این است که میانکنش‌های الکترواستاتیک بین پپتیدهای ضدمیکروبی و غشاهای دارای بار منفی فاکتور مهمی در انتخاب پذیری این پپتیدها نسبت به سلول های سرطانی باشد. AMPs بر روی غشاهای سلولی عمل می‌کنند، به طور ترجیحی به غشای سلولی متصل شده و اکثرا به وسیله‌ی نیروی الکترواستاتیک در داخل غشای سلولی جای می‌گیرند بعد به سرعت باعث قطع غشا و نشت محتویات داخل سلول و مرگ سلولی می‌شوند [۱۸].

۱-۲- پپتید ضدمیکروبی طبیعی پارداکسین

پارداکسین‌ها عضوی از خانواده‌ی AMPs جدا شده از یک ماهی دریایی[1] (*Pardachirus mormoratus*) به عنوان یک پلی‌پپتید نوروتوکسین[2] دوگانه دوست از ۳۳ آمینواسید تشکیل شده است. آزمایشات NMR نشان می می دهد که جهت‌گیری غشایی و میانکنش‌های این پپتید بستگی به ترکیبات لیپیدی در غشاهای دولایه‌ای دارد. پارداکسین، منافذ پایداری در وزیکول‌های لیپیدی خنثی[3] تشکیل می‌دهد که باعث آزاد شدن محتویات وزیکولی وزیکولی بدون از دست دادن یکپارچگی آن‌ها می‌شود، این پپتید وزیکول‌ها را به طور موثری با تشکیل منفذ،

[1] Marine fish
[2] Neurotoxin
[3] Zwitteronic lipid vesicles

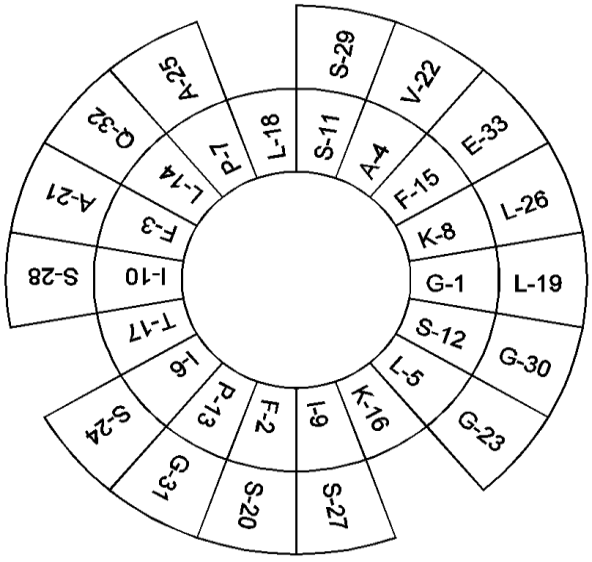
نفوذپذیر می‌کند تا این که وزیکول را تخریب کند [۱۹-۲۱]. فیزیولوژی[1] و فارماکولوژی[2] پارداکسین‌ها نسبتا پیچیده است، طیف اثر این پپتید ضدمیکروبی از تداخل با حمل و نقل یونی در سلول‌های اپی تلیوم[3] و در سلول‌های عصبی[4] تا تغییرات مورفولوژیک در وزیکول‌های غشاهای لیپیدی است [۱۹].

۱-۲-۱- ویژگی‌های پپتید پارداکسین

۱-۲-۱-۱- توالی

پپتید پارداکسین، شامل ۳۳ اسیدآمینه و دارای توالی زیر می‌باشد [۱۹].

GFFALIPKII SSPLFKTLLS AVGSALSSSG GQE

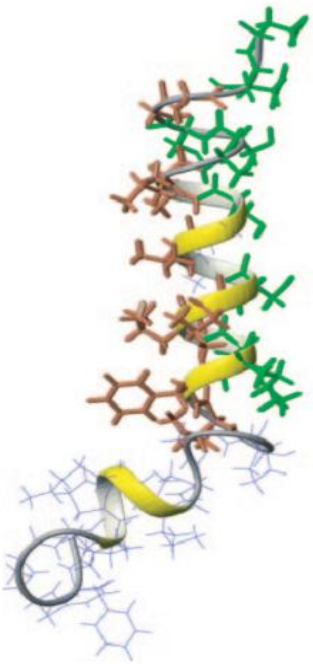


شکل ۱-۲ توزیع باقیمانده های پپتید پارداکسین بوسیله ی چرخ مارپیچ

[1] Physiology
[2] Pharmacology
[3] Epithelium cells
[4] Nerve cells

۱-۲-۱-۲- ویژگی دوگانه دوستی

پپتیدهای مارپیچ دوگانه دوست دارای بار مثبت گروه مهمی از پپتیدهای ضدمیکروبی هستند. ساختار پارداکسین در شکل ۱-۴ نشان دهنده‌ی ماهیت دوگانه دوستی هلیکس C- ترمینال است. آزمایشات NMR حالت جامد[1] نشان می‌دهد، بخش N- ترمینال این پپتید در فرآیند جاسازی و تجمع این پپتید درون غشاهای دولایه‌ای نقش داشته باشد. از سوی دیگر هلیکس C- ترمینال که به طور قابل ملاحظه‌ای دوگانه دوست است و شامل باقیمانده‌های ۳۰-۱۷ است، در تشکیل کانال‌های یونی نقش دارد. این هلیکس دوگانه دوست عرض غشا را طی می کند، که نقش آن در تشکیل کانال‌های یونی را اثبات می کند [۱۵و۱۸].



شکل ۱-۳ ساختار پارداکسین نشان دهنده ی باقیمانده های آبگریز (ارغوانی) و باقیمانده های آبدوست (سبز) [۱۹].

[1] Solid-state Neuclear Magnetic Resonance

۱-۲-۲- ساختار دوم پپتید پارداکسین

طیف سنجی‌های NMR حالت جامد و دورنگ نمایی دورانی (CD[1]) نشان می‌دهد که ساختار پارداکسین با تغییر pH و بنابراین پروتونه شدن پپتید تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد، اما نسبت به وزیکول‌های لیپیدی و حلال‌های تقلیدی[2] غشا خیلی حساس است [۱۵]. آزمایشات نشان داده که تمایل اتصال یا ثابت پیوستگی بین این پپتید و میسل‌های لیپوپلی ساکاریدی[3] در دماهای مختلف یکسان است [۲۱].

۱-۲-۲-۱- ساختار دوم پپتید پارداکسین در محیط آبی

طیف سنجی‌های CD نشان می‌دهد که پارداکسین کنفورماسیون‌هایی شبیه راندوم کویل در محلول‌های آبی دارد. این پپتید در محلول‌های آبی تجمع پیدا کرده و ترامرهایی را تشکیل می‌دهد. این پپتید اغلب در محلول‌های آبی در pH~۶/۵ نامحلول است، محلول‌های پپتیدی فقط در pH پایین تر (۴/۵~) آشکار می‌شود [۱۵، ۱۸و۱۹].

۱-۲-۲-۲- ساختار دوم پپتید پارداکسین در محیط غشایی

طیف سنجی‌های CD نشان می‌دهد که به محض افزودن مقداری تری فلور اتانل (TFE[4]) و غشاهای فسفولیپیدی این پپتید کنفورماسیون‌های مارپیچی[5] اتخاذ می‌کند. مطالعات NMR نشان می‌دهد که درمحلول های میسلی DPC[6]، که پارداکسین تمایل بیشتری نسبت به این نوع از غشاهایی که شامل فسفاتیدیل کولین است نشان می‌دهد، دارای دو قطعه‌ی جداگانه است [۱۵،۱۸،۱۹و۲۲]. این دو قطعه شامل باقیمانده‌های ۳۰-۱۶ (۰/۴۵~ آنگستروم) و باقیمانده‌های ۱۲-۲ (۰/۲۲~ آنگستروم) می‌باشد. این نشان می‌دهد که باقیمانده‌ی پرولین در موقعیت ۱۳، ممکن است بین دو دمین کاملا مشخص نقطه انعطاف پذیری را ایجاد کند. دومین ساختاری

[1] Circular Dichroism
[2] Mimetic
[3] Lipopolysaccharide micelles
[4] Trifluorethanol
[5] Helical
[6] Sodium Dodecylphosphocholine