بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيمِ

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تربیت معلّم آذربایجان
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی - علوم سلولی ملکولی

مطالعه تشکیل نانوپورها در غشاهای زیستی به کمک شبیه سازی های دینامیک مولکولی coarse-grained و all-atom

استاد راهنما:
دکتر فرامرز مهرنژاد

پژوهشگر:
آرزو رحمن پور اقدم

شهریور ماه /1390
تبریز / ایران

چکیده

امروزه طراحی داروهای کاربردی جدید بر ضد میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروهای موجود، پدیده‌ای چالش‌انگیز در زمینه سلامت عمومی و پیشگیری از بیماری‌ها می‌باشد. بدین منظور می‌توان از عوامل بالقوه ضدمیکروبی طبیعی کمک گرفت. در بین این عوامل طبیعی، پپتیدهای ضدمیکروبی شایان توجه می‌باشند. پپتیدهای ضدمیکروبی نقش مهمی در مکانیسم های دفاع ایمنی ذاتی میزبان در اغلب موجودات زنده شامل مهره‌داران و بی‌مهره ها و نیز گیاهان را بر عهده دارند. این پپتیدهای ضدمیکروبی دارای پتانسیل فعالیت گسترده در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پارازیت‌های مختلف می‌باشند. این پپتیدهای کوچک کاتیونی از طریق میانکنش با غشا و افزایش نفوذپذیری غشا عمل می‌نمایند. پپتیدهای ضدمیکروبی به سبب فعالیت در طیف گسترده و اینکه نسبت به آن‌ها مقاومت ایجاد نمی‌شود، به‌عنوان کلاس جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. پیسیدین‌ها پپتیدهای کاتیونیک ضدمیکروبی هستند که برای اولین بار از بافت ششی ماهی خاردار خطخطی جدا شده‌اند. این پپتید دارای 22 اسیدآمینه بوده و در انتهای آمینی به‌شدت حفاظت شده و غنی از باقیمانده‌های هیستیدین و فنیل‌آلانین می‌باشد. در بین خانواده پیسیدین‌ها، پیسیدین 1 دارای بالاترین فعالیت ضدمیکروبی است. بررسی اثرات پپتیدهای ضدمیکروبی بر روی غشا و مطالعه چگونگی عملکرد این پپتیدها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی به‌منظور استفاده از آن‌ها به‌عنوان کاندیداهای طبیعی در طراحی آنتی‌بیوتیک‌های جدید ارائه دهد. بدین منظور چگونگی پاسخ دو غشای مدل متداول به نام POPC و POPG در مقابل پپتید ضدمیکروبی پیسیدین 1 بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از بررسی ساختار پپتید تاکید بر اهمیت انعطاف‌پذیری ساختاری پپتید در مرحله ورود به غشا دارد. همچنین نمودار چگالی برای پپتید از ابتدای حرکت از محیط آبی تا قرارگیری در مرکز غشا محاسبه شد که بیانگر نفوذ بهتر پیسیدین در غشای POPC نسبت به POPG می‌باشد. یک میانکنش الکترواستاتیک قوی بین گروه سر باردار لیپید و یون‌هایی با بار مخالف در نزدیک سطح غشای POPG مشاهده شده که مانع از نفوذ پپتید به درون غشا می‌گردد. علاوه بر این نشان داده شد که دو غشای مدل مورد استفاده در این مطالعه رفتار متفاوتی در مقابل حضور پیسیدین از خود نشان می‌دهند. از این رو پیشنهاد می‌شود که ترکیب غشا می‌تواند عامل مهمی در تعیین توانایی کشندگی داروهای پپتیدهای در از بین بردن گونه‌های باکتریایی خاص باشد.

کلمات کلیدی: پپتیدهای ضدمیکروبی، پیسیدین 1، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، POPC ، POPG.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه
چکیده..... یک
فصل اول: مقدمه
1-1- سلول 2
1-1-1- غشای سلولی 2
1-2- پپتیدهای ضدمیکروبی 5
1-2-1- کشف پپتیدهای ضدمیکروبی 6
1-2-2- ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیکی پپتیدهای ضدمیکروبی 7
1-2-3- مکانیسم عمل پپتیدهای ضدمیکروبی 9
1-2-4- پیسیدین 16
1-2-4-1- پیسیدین 1 17
فصل دوم: روش‌ها
2-1- شبیه سازی کامپیوتری 20
2-2- طراحی شبیه سازی برای محیط آب 22
2-2-1- انتخاب و دستیابی به ساختار اولیه 23
2-2-2- آماده سازی فایل اولیه برای شبیه سازی 23
2-2-3- ساختن جعبه شبیه سازی.....23
2-2-4- اضافه کردن آب 23
2-2-5- کمینه سازی انرژی 24
2-2-6- متعادل کردن محدودیت های مکانی سیستم با شبیه سازی 24
2-2-7- اجرای شبیه سازی 24
2-3- طراحی شبیه سازی برای محیط غشا 28
2-4- روش coarse-grained 33
فصل سوم: نتایج
3-1- نتایج مربوط به روش all-atom.....37

3-1-1- تغییرات ساختاری و دینامیکی پروتئین 37
3-1-2- میانکنش بین پروتئین و غشا 38
3-1-3- تغییرات خصوصیات فیزیکی غشا 46
3-2- نتایج مربوط به روش coarse-grained 49
فصل چهارم: بحث و پیشنهادات
4-1- بحث 52
4-2- پیشنهادات 59
منابع 60
چکیده انگلیسی

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه
جدول1-1- ساختارهای متنوع پپتیدهای ضدمیکروبی 7
جدول2-1- فایل em.mdp مورد نیاز برای مرحله کمینه سازی انرژی در شبیه سازی.....25
جدول2-2- فایل pr.mdp مورد نیاز برای مرحله متعادل سازی محدودیت های مکانی در شبیه سازی.....26
جدول2-3- فایل md.mdp مورد نیاز برای اجرای شبیه سازی 27
جدول 2-4- فایل nvt.mdp 29
جدول 2-5- فایل npt.mdp 30
جدول 2-6- فایل توپولوژی برای سیستم pis-1-POPG 31
جدول 2-7- فایل توپولوژی برای سیستم pis-1-POPC 32
جدول 3-1- درصد میانکنش های هر نوع آمینواسید با غشاها 43
جدول 3-2- درجه پایداری زنجیره‌های هیدروکربنی 47

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه
شکل1-1-لیپیدهای دوگانه‌دوست در محیط‌های آبی به‌صورت خودبه‌خودی به صورت ساختارهای مختلفی تجمع می‌یابند.....3
شکل1-2- انواع کنفورماسیون و ساختار پپتیدهای ضدمیکروبی 8
شکل1-3-جاذبه بین پپتیدهای ضدمیکروبی و غشاهای میکروبی آنیونی در اثر میانکنش‌های الکترواستاتیک افزایش می‌یابد 10
شکل1-4- مکانیسم‌های مختلف نفوذپذیر کردن غشا 11
شکل1-5- ساختار منفذی سوراخ-بشکه‌ای تشکیل شده توسط پپتیدهای ضدمیکروبی 12
شکل1-6-تفاوت ساختمانی بین مدل منفذی سوراخ-بشکه‌ای (a) و مدل منفذی مارپیچی (b).....13
شکل1-7- ساختار منفذی مارپیچی تشکیل شده توسط پپتیدهای ضدمیکروبی 14
شکل1-8- مدل شبه فرشی تشکیل شده توسط پپتیدهای ضدمیکروبی 15
شکل 1-9- شکل شماتیک از ساختار پیسیدین.....17
شکل 2-1- مقایسه ساختار پیسیدین در دو مدل (a) all-atom و (b) coarse-grained 34
شکل 2-2- مقایسه ساختار مولکولی در دو مدل all-atom و coarse-grained 35
شکل 3-1- جذر میانگین مربعات نوسان پیسیدین 1 38
شکل3-2- فاصله بین مرکز جرم پیسیدین با دولایه‌های لیپیدی 39
شکل 3-3- نقشه چگالی سیستم‌ها پروتئین و غشا 40
شکل 3-4- تابع توزیع شعاعی بین مولکول های لیپید POPG و یونهای سدیم 41
شکل3-5- تعداد تماس‌های پروتئین با غشا 42
شکل3-6- تابع توزیع شعاعی برای باقیمانده His3 43
شکل 3-7 - تابع توزیع شعاعی برای باقیمانده Lys 14 44
شکل3-8- نمودار نیروی میانگین پتانسیل (PMF) برای باقیمانده فنیل آلانین 45
شکل 3-9- میانگین نیروی پتانسیل (PMF) برای باقیمانده Arg18 46
شکل 3-10- پارامتر میزان نظم زنجیره‌های آسیل هیدروکربنی 47
شکل 3-11- تغییرات ضخامت غشا در طول زمان شبیه‌سازی 48

شکل 3-12- جذر میانگین مربعات انحراف پیسیدین در خارج غشا 49
شکل3-13- کمترین فاصله بین پیسیدین وغشای DPPC 50
شکل 3-14- جذر میانگین مربعات انحراف پیسیدین در داخل غشا.....50
شکل4-1- تصویر شماتیک از عملکرد پپتیدهای ضدمیکروبی 53
شکل 4-2- چگونگی میانکنش متفاوت پیسیدین با دو غشای POPC و POPG. 57

فصل اول :

مقدمه

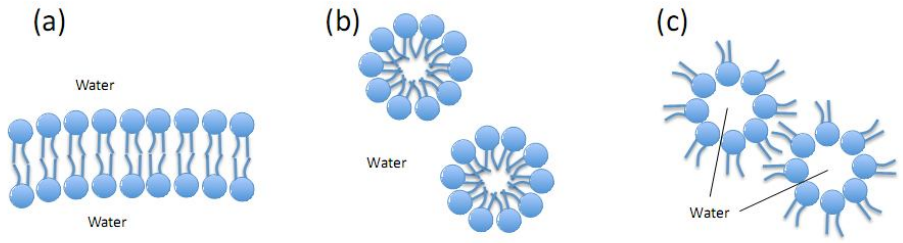
1-1- سلول

به‌طور عمده سلول به واحدهای سازنده حیات اطلاق می گردد. در واقع سلول‌ها کوچکترین واحد زنده هستند که پایه‌ای و اساسی‌ترین فعالیت زیستی مثل تقسیم و انتقال اطلاعات زیستی در آن به نمایش گذاشته می‌شود[1]. تعداد سلول‌ها در بدن انسان بی‌شمار بوده، اگرچه گوناگونی آنها تنها در حدود 200 نوع می‌باشد که هر کدام ساختار فیزیکی خاص خود را دارد. برخی مانند سلول‌های عصبی دراز و شاخه‌شاخه بوده و یا بعضی مثل گلبول‌های قرمز بسیار انعطاف-پذیر می‌باشند. اما به هرحال ساختار اصلی تمامی سلول‌ها با داشتن غشای پلاسمایی که دربرگیرنده سیتوپلاسم و اجزای سلول است، مشترک می‌باشند، اگرچه ساختمان غشای سلول و اندامک‌ها از گونه‌ای تا گونه‌ای دیگر متفاوت است[2].

1-1-1- غشای سلولی

جزء اصلی ساختاری غشاهای سلولی، دولایه لیپیدی[1] می‌باشد[1]. لیپیدها 50% توده غشای سلولی را شامل می‌شوند[2]. این مولکول‌های لیپیدی سازنده غشا دوگانه‌دوست[2] بوده، دارای یک گروه سر قطبی (آبدوست) و دم‌های غیرقطبی (آبگریز) می‌باشند. این مولکول‌های لیپیدی قادرند در آب به‌صورت خودبخودی تجمع یافته و گروه‌های سر قطبی، دم‌های غیرقطبی را از محیط آبی جدا می‌کنند. بسته به غلظت، اندازه و شکل مولکول‌های لیپیدی ساختار ایجاد شده می‌تواند به‌صورت میسل[3]، میسل معکوس[4] و یا دولایه لیپیدی باشد[2](شکل 1-1).

[1] Lipid Bilayer
[2] Amphipathic
[3] Micelle
[4] Inverted Micelle



شکل1-1-لیپیدهای دوگانه‌دوست در محیط‌های آبی به‌صورت خودبه‌خودی به صورت ساختارهای مختلفی تجمع می‌یابند. (a)دولایه لیپیدی (b)میسل (c)میسل معکوس

بخش اصلی غشاهای سلولی را فسفولیپیدها تشکیل می‌دهند. به طور عمده غشاهای سلولی شامل دو لایه فسفولیپید هستند که زنجیره‌های هیدروکربنی آنها هسته آبگریزی به ضخامت 3-4 نانومتر در هر تک لایه از غشاهای زیستی را تشکیل می دهند[1].ترکیب لیپیدی هر لایه از غشا بستگی به نوع سلول و بخش سلولی داشته و لزوما متقارن نمی‌باشد[3]. هر لایه لیپیدی دارای دو ویژگی عمده می‌باشد اول اینکه هسته آبگریز سد غیر قابل نفوذی را در مقابل انتشار محلول‌های آبدوست در عرض غشا تشکیل می‌دهد، اگرچه عملکرد این سد ساده با دخالت یک سری پروتئین-های غشایی در انتقال یک سری مولکول‌های خاص تعدیل می‌شود. ویژگی دوم دو لایه لیپیدی پایداری و استحکام آن به‌واسطه میانکنش‌های آبگریزی و واندروالسی بین زنجیره‌های لیپیدی می-باشد.

خاصیت آبگریزی غشاهای سلولی هم برای حفظ فعالیت عدم نفوذپذیری آن و هم به عنوان ماتریکسی برای نگهداری پروتئین‌های غشایی ضروری است[4]. ترکیب ساختاری غشا خصوصیات و ویژگی‌هایی همچون سیالیت[1]، خمیدگی[2]، توزیع بار و ضخامت آن را تحت تاثیر قرار داده و موقعیت‌های مختلف برای قرارگیری و عملکرد پروتئین‌های غشایی را فراهم می‌کند[5و6].

[1] Fluidity
[2] Curvature

غشا نقش حیاتی در بیوشیمی سلول‌ها بازی می‌کند که بیانگر نقش آن در تعیین شکل سلول و اندامک‌ها می‌باشد[7] مدل موزائیک سیال[1] پیشنهاد شده توسط سینگر و نیکلسون در 1972 بیان کرد که غشاهای بیولوژیکی ساختارهای فوق مولکولی می‌باشند که سدهای موثری را در برابر مواد محلول آبگریز و عوامل بیماریزا را تشکیل می‌دهند در حالی که همزمان اجازه عبور مواد و اطلاعات مفید را می‌دهند[8]. این دو لایه در دمای فیزیولوژیک سیال می باشد و بنابراین لیپیدها و پروتئین ها هر دو آزادانه در غشاء انتشار می یابند[9]. بسیاری از فرایندهای پیام رسانی سلولی، متابولیسم و نقل و انتقال در سطح و در میان همین ساختارهای ظریف اتفاق می‌افتد. در این مدل لیپیدها ماتریکس نفوذناپذیر به مولکول‌های آبدوست را تشکیل می‌دهند که در آن‌ها پروتئین‌هایی نهفته‌اند که عملکرد-های خاصی را بروز می‌دهند. از اینرو هرروزه علاقه بیشتری نسبت به مطالعه نقش‌های لیپیدها و پروتئین‌ها در ارتباط با یکدیگر و در نهایت طبیعت پویای[2] غشا به‌وجود می‌آید[8].

به منظور بررسی چگونگی اجرای نقش‌های حیاتی توسط غشاهای زیستی بسیار پیچیده، سیستم های مدل گوناگونی طراحی شد شامل لیپید هایی همچون پالمیتوئیل‌الئوئیل‌فسفاتیدیل‌گلیسرول (POPG)[3]، پالمیتوئیل‌الئوئیل‌فسفاتیدیل‌کولین (POPC)[4]، دی‌پالمیتویل‌فسفاتیدیل‌کولین (DPPC)[5]، دی‌مریستوئیل‌فسفاتیدیل‌کولین (DMPC)[6]، دی‌لورئیل‌فسفاتیدیل‌اتانول‌امین (DLPE)[7] تولید می شودکه با حفظ ساختار پایه دو لایه لیپیدی سیستم در حدی ساده شده‌اند که نقش های اجزاء سازنده آن به طور جداگانه قابل ارزیابی و بررسی بوده و چگونگی عملکرد و دینامیک آنها را قابل مشاهده باشد[10]. این سیستم‌های غشایی از یک گروه سر[8] فسفولیپیدی و دو دم[9] هیدروکربنی بلند تشکیل می شوند. اجزاء سر و دم ها، نوع غشاء را تعیین می کنند. در سیستم های فوق قسمت اول نام مربوط به دم هیدروکربنی مانند پالمیتوئیل‌الئوئیل (PO) و قسمت دوم مانند فسفاتیدیل‌گلیسرول (PG) مربوط به گروه سر می‌باشد.

[1] Fluid Mosaic
[2] Dynamic
[3] Palmitoyl Oleoyl Phosphatidyl Glycerol
[4] Palmitoyl Oleoyl Phosphatidyl Choline
[5] Di Palmitoyl Phosphatidyl Choline
[6] Di Myristoyl Phoshatidyl Choline
[7] Di Lauroyl Phosphatidyl Ethanolamine
[8] Head Group
[9] Tail

1-2- پپتیدهای ضدمیکروبی

اگرچه اکتشاف پنی‌سیلین توسط الکساندر فلمینگ در سال 1928 موفقیت قابل توجهی در زمینه علم داروسازی بشمار می‌آمد و به‌صورت معجزه‌آسایی سبب درمان بیماری‌های غیرقابل علاج در آن زمان شد، اما در کنار این خدمت عظیم آنتی‌بیوتیک‌ها در سلامت عمومی، سبب بروز عارضه جانبی به‌نام باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک[1] گردید. با استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها طی دهه‌های گذشته، ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک اجتناب‌ناپذیر بوده، اگرچه با تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر از سرعت گسترش آنها کاسته شده است. علاوه‌براین عوامل طبیعی مثل جهش‌ها و انتخاب طبیعی در جمعیت میکروبی ارگانیسم‌های چندسلولی هم سبب بروز این مشکل بوده‌است[11].

صرف‌نظر از علت و منشا پیدایش این مشکل، جامعه علمی سعی در پیداکردن روش‌هایی برای پاسخ به افزایش خطر گسترش این باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارد. یکی از این روش‌ها طراحی و تولید ترکیبات ضدمیکروبی جدید به‌عنوان جایگزین یا مکمل آنتی‌بیوتیک‌های موجود است. در بین کاندیداهای مختلف پپتیدهای ضدمیکروبی[2] به‌عنوان گزینه مناسبی برای این عمل در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است[12- 15]. این پپتیدها درواقع سلاح‌های قدیمی تکاملی[3] موجودات زنده پرسلولی یعنی گیاهان و جانوران هستند که در طول سالیان سال همواره در مقابل عوامل میکروبی از آن‌ها محافظت کرده‌اند[13]. ارگانیسم‌های پرسلولی در تماس دائمی با میکروب-های بیماری‌زا هستند که در وهله اول توسط سیستم ایمنی ذاتی[4] در مقابل این عوامل محافظت میشوند. پپتیدهای ضدمیکروبی یکی از اصلی‌ترین اجزای سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند. استفاده طولانی مدت از این پپتیدها این تصور را در ذهن ایجاد می‌کند که میکروب‌ها قادر نیستند به راحتی در مقابل آن‌ها مقاوم شوند. این همان ویژگی قابل‌توجه پپتیدهای ضدمیکروبی است که آن‌ها را ابزار جدیدی برای مقابله با عوامل بیماری‌زا می‌دانیم[12].

[1] Antibiotic Resistant
[2] Antimicrobial Peptides(AMPs)
[3] Evolutionary Ancient Weapons
[4] Innate Immune System

مطالعات گسترده و آزمایشات کلینیکی مختلفی در ارتباط با پپتیدهای ضدمیکروبی صورت گرفته‌است که در زمینه طراحی و تولید پپتیدهای اصلاح‌شده به‌عنوان عوامل درمانی به آن‌صورت موثر واقع نشده‌است و تنها یک یا دو مورد مجوز لازم به عنوان داروی ضدمیکروبی را از وزارت غذا و داروی آمریکا[1] دریافت کرده‌اند[12و 14]. عدم موفقیت در این زمینه به‌علت فعالیت میکروبی ضعیف و سمیت[2] بالای آن‌ها برای سلول‌های میزبان می‌باشد[12]. در جریان آزمایشات پپتیدهای ضد-میکروبی به اندازه کافی برای از بین‌بردن عامل بیماری‌زا قوی نبوده و زمانی هم که قادر به نابودی آن شده‌اند، نسبت به سلول‌های میزبانی که باید دست‌نخورده باقی بمانند هم سمیت نشان داده‌اند. این نتایج سبب شد که دانشمندان با یک سوال عمده روبرو شوند که چگونه می‌توان پپتیدهایی فعال‌تر با قدرت میکروب‌کشی بالاتر و در عین‌حال دارای خاصیت انتخابی[3] برای تمایز قائل شدن در مورد سلول‌های میزبان طراحی نمود.

1-2-1- کشف پپتیدهای ضدمیکروبی

اطلاعات اولیه مربوط به فعالیت ضدمیکروبی بافت‌های طبیعی و مایعات بدن مربوط به اواخر قرن نوزدهم یعنی زمانی است که مواد ضدمیکروبی در خون، لکوسیت‌ها و بافت‌های لنفی مشاهده شد[15و16]. اما در آن زمان هویت اصلی این مواد مشخص نبود تا در قرن بیستم این ترکیبات ضد-میکروبی براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی طبقه‌بندی شد[17-20]. برپایه اطلاعات اندکی که از ساختار آن‌ها در اختیار بود، این عوامل ضدمیکروبی پروتئین‌های بازی کوچک، پپتیدهای بازی و یا پپتیدهای بازی خطی[4] نامیده شدند[16]. چند دهه بعد با جداسازی ماگاینین[5] دوزیستی از پوست قورباغه [21]، سسروپین[6] از حشرات [22] و دیفنسین‌ها[7] از پستانداران [23]، پپتیدهای ضدمیکروبی مرکز توجه مطالعات دانشمندان قرار گرفت. این دستاوردها و افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود سبب شد که تلاش‌های بیشتری نسبت به شناسایی پپتیدهای ضد-

[1] US Food and Drug Administration
[2] Toxicity
[3] Selective
[4] Basic Linear Peptides
[5] Magainin
[6] Cecropin
[7] Defensin

میکروبی صورت گیرد به‌طوری‌که بیش از 890 پپتید ضدمیکروبی شناسایی شده و ساختار سه‌بعدی بیش از 50 عدد از آنها تعیین شده‌است.

1-2-2- ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیکی پپتیدهای ضدمیکروبی

پپتیدهای ضدمیکروبی به‌صورت فراوان در طبیعت یافت می‌شوند[13] و به‌صورت ژنتیکی کد شده و یکی از اجزای اصلی ایمنی ذاتی را هم در جانوران وهم در گیاهان تشکیل می‌دهند[24]. سه خانواده از پپتیدهای ضدمیکروبی در بدن انسان مشاهده شده است: دیفنسین‌ها، کاتلیسیدین[1]ها، هیستاتین[2]ها[25- 27].

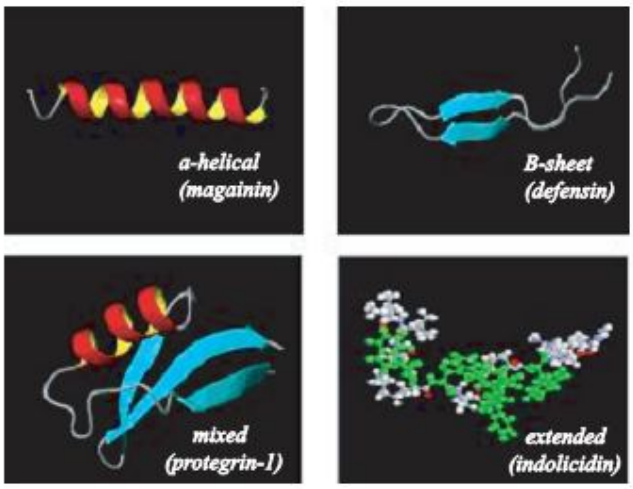
پپتیدهای ضدمیکروبی را می‌توان به گروه‌های ساختاری مختلفی تقسیم نمود : پپتیدهایی با صفحات بتا که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی بهم متصلند ویا به‌صورت صفحه بتا/هلیکس آلفا هستند که شامل دیفنسین‌ها می‌باشند[28- 31]، پپتیدهای آلفاهلیکسی مثل سسروپین در حشرات و ماگاینین در دوزیستان[33] و پپتیدهایی که مملو از اسیدآمینه‌های خاصی چون پرولین، هیستیدین، تریپتوفان و یا گلیسین می‌باشند و نیز پپتیدهایی که ساختار مشخصی ندارند(جدول1-1) (شکل1-2).

جدول1-1- **ساختارهای متنوع پپتیدهای ضدمیکروبی**

Peptide structure	Number	Percentage
α-Helical structure	77	14.67
β-Structure without disulfide bonds	4	0.76
Both α-helix and β-structure	13	2.47
Rich in specific residues	53	10.09
β-Structure with disulfide bonds	170	32.38
No known structure	208	39.62

[1] Cathelicidin
[2] Histatin

این پپتیدها در واقع پروتئین‌های کوتاهی هستند که از 10 تا 15 باقی‌مانده[1] اسیدآمینه‌ای تشکیل شده‌اند[33]. به‌طور کلی 20 نوع اسیدآمینه مختلف در طبیعت وجود دارد که هرکدام خواص فیزیکی و شیمیایی مختلفی را دارا هستند که ویژگی‌های پروتئین‌ها و پپتیدها بسته به توالی اسیدآمینه-ای سازنده آن‌ها می‌باشد[33]. هر پروتئینی فعالیت مخصوص خود را با توجه به توالی اسیدآمینه‌ای منحصربه‌فرد خود، دارا می‌باشد. عمدتا پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونیک و دارای بار مثبت بوده وشامل باقی‌مانده‌های اسیدآمینه‌ای مختلف با بار مثبت می‌باشند[13و15]. همان‌گونه که ازاین مطلب بر می‌آید بار مثبت این پپتیدها توانایی فعالیت انتخابی در مقابل غشاهایی با بار منفی همچون غشاهای باکتریایی را به آن‌ها می‌دهد[34و35].



شکل1-2- انواع کنفورماسیون و ساختار پپتیدهای ضدمیکروبی

[1] Residue

این پپتیدها دارای ساختار دوگانه‌دوست بوده که این به علت توالی اسیدآمینه‌ای آن‌ها می-باشد و ساختار فضایی این پپتیدها به‌گونه‌ایست که باقی‌مانده‌های اسیدآمینه‌ای آبدوست نسبت به آبگریز در دو سمت مخالف جهت هم در پپتید قرار گرفته‌اند[13و15]. این آرایش فضایی این امکان را به پپتید می‌دهد که از یک سمت با آب (ناحیه قطبی) و از سمت دیگر با بخش لیپیدی غشا (ناحیه غیرقطبی) وارد میانکنش شود. بار مثبت و ساختار دوگانه‌دوست پپتیدهای ضدمیکروبی دو فاکتور عمده هستند که توانایی در هم گسیختن غشاهای سلولی را به آن‌ها می‌بخشد[15].

1-2-3- مکانیسم عمل پپتیدهای ضدمیکروبی

در طی سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در زمینه مکانیسم و چگونگی عمل پپتیدهای ضدمیکروبی صورت گرفته‌است [13] و همواره علاقه زیادی برای آگاهی در مورد عواملی که پپتید را قادر می‌سازد تا حداکثر عملکرد علیه عوامل میکروبی و حداقل تاثیر روی سلول‌های میزبان را داشته باشد، وجود داشته است[36]. عملکرد ضدمیکروبی این پپتیدها شامل مراحل زیر می‌باشد:

1.تمایز بین سلولی[1]

2.اتصال و پیوستگی[2] با غشا

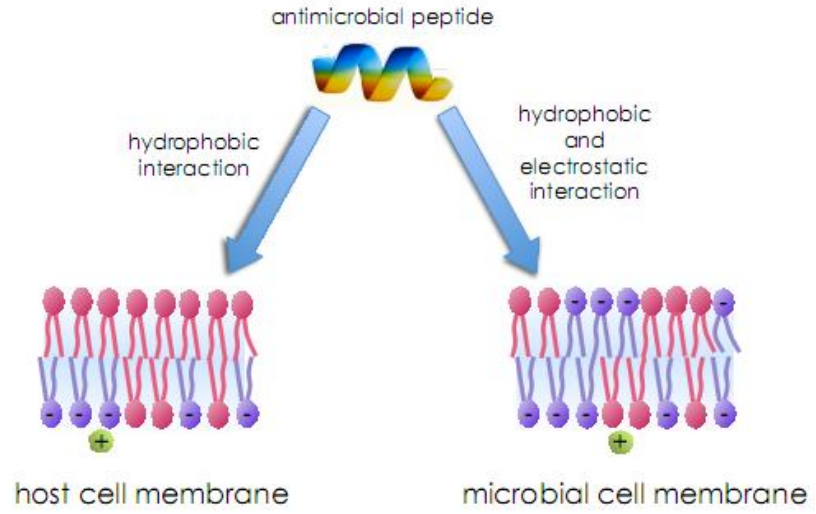
3.ازهم‌گسیختگی[3] غشا

نشان داده شده‌است که پپتیدهای ضدمیکروبی قادرند در مدت زمان 15-90 دقیقه، باکتری‌ها را از بین ببرند[15]. یکی از ویژگی‌های بسیار مهم فعالیت این پپتیدها توانایی آنها در تشخیص سلول‌های هدف در میان توده سلول‌های میزبان می‌باشد[13]. این پپتیدها با استفاده از تفاوت‌های ساختاری بین سلول‌های میکروبی و سلول‌های میزبان این عمل را انجام می‌دهند. غشاهای خارجی در باکتری‌ها شامل لیپیوپلی‌ساکارید و نیز غشاهای سیتوپلاسمی آن‌ها مملو از لیپیدهای آنیونی همچون فسفاتیدیل‌گلیسرول و کاردیولیپین است در حالی‌که در مقابل در سلول‌های پستانداران غشای خارجی به‌طور عمده از فسفولیپیدهای خنثی مثل فسفاتیدیل‌کولین و اسفنگومیلین تشکیل شده‌اند که پپتیدهای ضدمیکروبی به خاطر خاصیت آبگریزی پایین تمایل کمتری به آن‌ها دارد [35]. پپتیدهای

[1] Cell Discrimination
[2] Association
[3] Rupture

ضدمیکروبی عمدتا شامل باقی‌مانده‌های اسیدآمینه‌هایی با بار مثبت در ساختار خود می‌باشند که میانکنش بین غشای آنیونی و پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی در اثر میانکنش‌های کلمبی[1] تقویت می-شود که خود منشا انتخابگری سلولی پپتیدهای ضدمیکروبی می باشد[13و35](شکل1-3).

تفاوت عمده دیگر در ترکیب غشاهای پروکاریوتی و یوکاریوتی وجود مقدار فراوان استرول[2] در سلول‌های یوکاریوتی است که سبب استحکام غشا می‌گردد همان‌طور که در مورد مقاومت سلول های اریتروسیت انسانی در مقابل حمله ماگاینین2 نشان داده شده است[37].



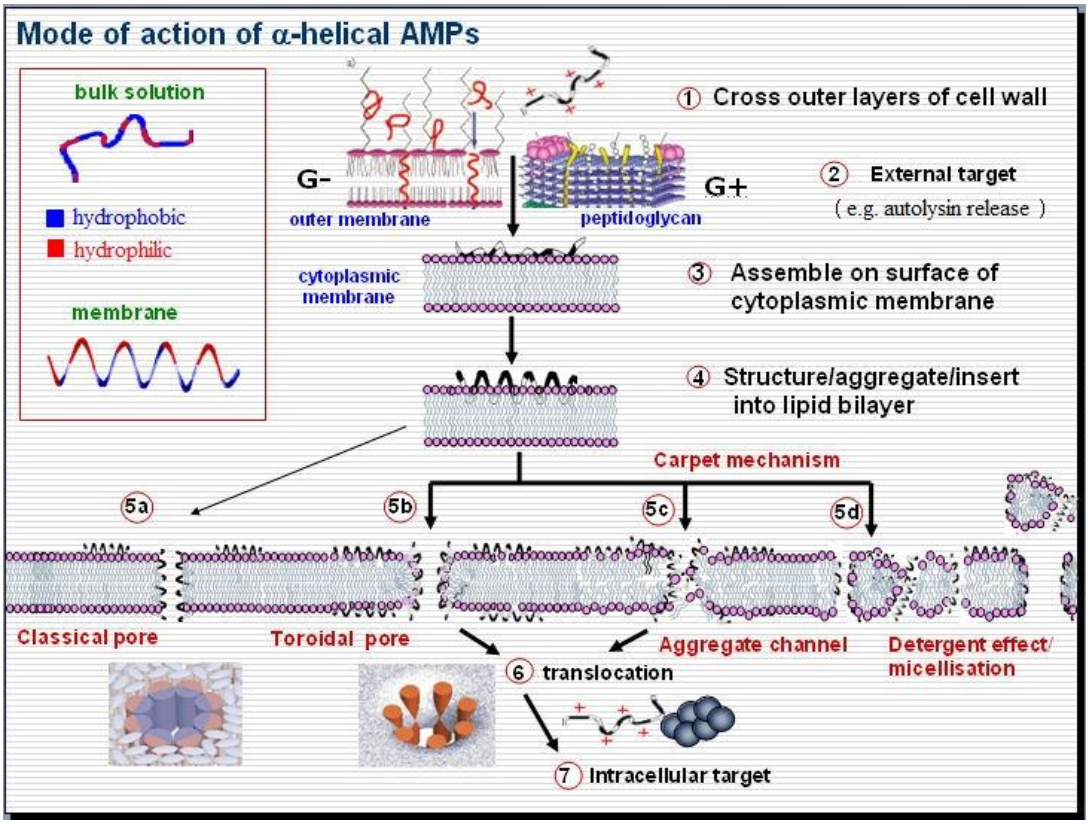
شکل1-3-جاذبه بین پپتیدهای ضدمیکروبی و غشاهای میکروبی آنیونی در اثر میانکنش‌های الکترواستاتیک افزایش می‌یابد.

پپتیدهای‌ضدمیکروبی به دو صورت وابسته‌به‌گیرنده[3]و غیروابسته‌به‌گیرنده عمل می-کنند[15و39].

قسمت عمده پپتیدهایی که به صورت غیر وابسته به گیرنده عمل می‌کنند پپتیدهای کاتیونی کوچکی هستند که غشاهای باکتریایی با بار منفی را هدف قرار می‌دهند[40]. عموما این پپتیدهای ضد میکروبی در سطح غشا تجمع می‌یابند تا به یک غلظت حد آستانه[4] برسند که پس از آن به صورت

[1] Coulomb Interactions
[2] Sterol
[3] Receptor Mediated
[4] Threshold

خود سازمان دهی شده[1] به غشا متصل شده تا مسیری برای نفوذ به درون آن ایجاد کنند. تشکیل منفذ[2] توسط مکانیسم‌های مختلفی صورت می‌گیرد [15و40-42](شکل 1-4). در خارج غشا مونومرهای پپتید با تجمعات کوچک پپتیدی در تعادل هستند[43و44]. در داخل محلول آبی پپتیدها تا حد زیادی به‌صورت تانخورده[3] بوده [15و45] و در غشاهای هدف، به‌سطح غشا متصل شده و تا می‌خورند. در غلظت‌های پایین پپتید، اغلب آن‌ها به‌صورت موازی با سطح غشا به آن اتصال یافته و به‌صورت مونومر و یا تجمع‌یافته هستند[15]. با رسیدن به یک نسبت پپتید به غشای معین، یک منفذ تراغشایی[4] ظاهر می‌شود که در آن پپتیدها به‌صورت عمود بر غشا جهت‌گیری کرده‌اند[15و41].



شکل1-4- مکانیسم‌های مختلف نفوذپذیر کردن غشا

[1] Self-organized
[2] Pore
[3] Unfold
[4] Transmembrane pore