بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
ایاک نعبد و ایاک نستعین اهدنا الصراط المستقیم
صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم
ولا الضالین

دانشگاه الزهرا(س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی- گرایش میکروبی

عنوان:

شناسایی ژن سیکلوتید در یکی از گونه‌های بنفشه در ایران و آنالیز بیوانفورماتیکی توالی ژن و پروتئین آن

اساتید راهنما:

دکتر محبوبه ضرّابی دکتر عزت عسگرانی

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا کنعانی

دانشجو:

اکرم روشن

شهریور ۹۱

چکیده

سیکلوتیدها خانواده بزرگی از پپتیدهای گیاهی با فعالیت زیستی و ویژگی‌های ساختاری متمایز هستند، که در خانواده‌های گیاهی *Rubiacea*، *Cucurbitaceae* و *Violacea* بیان می‌شوند. غلظت نسبتا بالای سیکلوتید در بافت گیاهی و حضور ایزوفرم‌های متعدد در یک گیاه به تناسب تفاوت‌های فصلی و منطقه‌ای پیشنهاد می‌کند که سیکلوتیدها در گیاه نقش دفاعی دارند. سیکلوتیدها به دلیل فعالیت‌های زیستی متعدد از جمله ضد ویروس، ضد قارچ، ضد باکتری، ضد کرم، ضد آفات، ضد سرطان و... و نیز ساختار منحصر به فرد که پایداری حرارتی و آنزیمی بی نظیری به آنها بخشیده است، کاندید مناسبی برای مهندسی پروتئین جهت کاربردهای دارویی و کشاورزی ساخته است.

در حال حاضر خانواده سیکلوتیدها بیش از ۱۰۰ عضو دارد و تعداد بیشتری در حال کشف هستند. گفته می شود تعداد سیکلوتیدها در طبیعت بیش از ۱۰۰۰۰ نوع است.

هدف از این مطالعه استخراج ژن‌های کد کننده سیکلوتیدها از سه گونه *Viola odorata*، *V. occulta* و *V. ignobilis* است، تا از این طریق مسیر برای تولید آنها با استفاده از سیستم‌های بیانی باکتریایی و گیاهی فراهم شود. سیستم‌های بیانی نوترکیب برای تولید پپتیدهای حلقوی طرفداران زیادی دارد، و ممکن است در آینده روش اصلی برای تولید این پپتیدها شود. همچنین در این پژوهش اثرات ضد میکروبی مجموعه سیکلوتیدهای گونه *V.ignobilis* بررسی شد. برای رسیدن به این هدف از روش جزء گیری و استخراج با فاز جامد استفاده شد. مجموعه باکتری‌هایی که اثر سیکلوتیدهای استخراج شده روی آنها مطالعه شد عبارتند از: *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Xanthomonas oryzea*، *Bacillus sp.* و *Rizobium cicil*.

حضور ژن *vbc* در هر سه گونه مورد مطالعه به اثبات رسید. بررسی اثرات ضد میکروبی نشان داد از میان باکتری‌های بیماری زای انسانی *Staphylococcus aureus* بیشترین حساسیت را به پپتیدهای مورد مطالعه دارد. و در بین مجموعه باکتری‌ها بیشترین حساسیت مربوط به سویه *Xanthomonas oryzea* است، چراکه نقش ذاتی سیکلوتیدها در گیاه میزبان دفاع در مقابل آفات است.

فهرست

فصل اول مقدمه..... ۱

۱.۱پپتیدهای حلقوی طبیعی ۲

۱.۱.۱ پپتیدهای حلقوی در گیاهان ۲

۲.۱ ساختارها و فعالیتهای پپتیدهای حلقوی طبیعی ۴

۳.۱ سیکلوتیدها ۴

۱.۳.۱ تاریخچه کشف سیکلوتیدها ۵

۲.۳.۱ مشخصات خانواده بنفشه *(Violaceae)* به عنوان یکی از منابع سیکلوتیدها ۶

۳.۳.۱ فعالیتهای زیستی سیکلوتیدها ۷

۱.۳.۳.۱ فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها ۸

۲.۳.۳.۱ فعالیت ضد *HIV* ۱۲

۳.۳.۳.۱ فعالیت ضد حشرات ۱۲

۴.۳.۱ بررسی انعطاف پذیری ساختاری سیکلوتیدها ۱۴

۴.۱ همسانه سازی ژن ۱۵

۵.۱ استخراج سیکلوتیدها ۱۶

۶.۱ اهدف و اهمیت پژوهش ۱۷

فصل دوم مواد و روشها ۱۹

۱.۲ بخش اول: شناسایی ژن سیکلوتیدها ۲۰

۱.۱.۲ ابزار و وسایل ۲۰

۲.۱.۲ کیت های مورد استفاده در شناسایی ژن ۲۱

۳.۱.۲ مواد مورد استفاده در شناسایی ژن ۲۱

۴.۱.۲ سویه مورد استفاده ۲۱

۵.۱.۲ گونه های گیاهی مورد استفاده ۲۲

۶.۱.۲ آماده سازی محیط کشت ۲۲

۲.۶.۱.۲ آماده سازی محیط کشت *LB* جامد ۲۳

۳.۶.۱.۲ تهیه محلول آنتی بیوتیک ۲۳

۷.۱.۲ مراحل انجام پژوهش به صورت گام به گام ۲۴

۱.۷.۱.۲ تخلیص *DNA* به روش *C-TAB* ۲۴

۲.۷.۱.۲ ارزیابی غلظت و کیفیت *DNA* استخراج شده ۲۶

۳.۷.۱.۲ طراحی پرایمر ۲۸

۴.۷.۱.۲ انجام *PCR* و شناسایی ژن ۲۸

۵.۷.۱.۲ تخلیص باند اختصاصی از ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج *DNA* از ژل (*Fermentase DNA Extraction Kit Protocl*) ۳۰

۶.۷.۱.۲ تعیین توالی محصول *PCR* ۳۱

۷.۷.۱.۲ مستعد کردن باکتری *Escherichia coli (DH5α)* به روش کلرید کلسیم..... ۳۲

۸.۷.۱.۲ کلون کردن محصول *PCR* با استفاده از *TA Cloning vector*..... ۳۳

۹.۷.۱.۲ استخراج *DNA* پلاسمیدی ۳۵

۱.۹.۷.۱.۲ استخراج *DNA* پلاسمیدی در مقیاس کوچک (*Minipreparation*) به روش لیز قلیایی..... **۳۵**

۲.۹.۷.۱.۲ استخراج *DNA* پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید *Miniprep* (*Bioneer Plasmid Mini Extraction Kit Protocol*)..... **۳۸**

۲.۲ بخش دوم: استخراج سیکلوتید ۳۹

۱.۲.۲ ابزار و وسایل..... ۳۹

۲.۲.۲ مواد مورد استفاده در استخراج پپتید ۴۰

۳.۲.۲ گونه گیاهی مورد استفاده ۴۱

۴.۲.۲ مراحل تخلیص پپتید به صورت گام به گام..... ۴۱

۱.۴.۲.۲ استخراج سیکلوتید ۴۱

۲.۴.۲.۲ سنجش برد فورد ۴۲

۳.۴.۲.۲ تعیین میزان خلوص نمونه پپتیدی با روش *Tricin-PAGE*: ۴۳

۳.۲ بخش سوم: بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها..... ۴۷

۱.۳.۲ ابزار و تجهیزات لازم ۴۷

۲.۳.۲ مواد مورد نیاز..... ۴۷

۳.۳.۲ سویه های به کار رفته در این پژوهش ۴۸

۴.۳.۲ روش کار تعیین اثرات ضد میکروبی به روش انتشار شعاعی ۵۰

فصل سوم نتایج..... ۵۱

۱.۳ شناسایی ژن ۵۲

۱.۱.۳ استخراج *DNA* ژنومی از برگ گونههای مورد مطالعه ۵۲

۲.۱.۳ شناسایی ژنهای مورد نظر ۵۳

۳.۱.۳ آنالیز توالی یابی محصول *PCR* خالص ۵۵

۴.۱.۳ همسانه سازی ژن *vbc* حاصل از نمونه *Viola ignobilis* ۵۹

۱.۴.۱.۳ نتایج ایجاد سلول مستعد از سویه *Escherichia coli DH5α*..... ۵۹

۲.۴.۱.۳ نتایج حاصل از انتقال حامل درون سلول مستعد ۵۹

۳.۴.۱.۳ استخراج پلاسمید ۶۰

۲.۳ جداسازی و تخلیص سیکلوتید ۶۰

۱.۲.۳ بررسی وزن مولکولی سیکلوتید استخراج شده ۶۱

۳.۲.۳ تعیین مقدار پپتید با روش برد فورد ۶۲

۳.۳ بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها ۶۳

۱.۳.۳ تأثیر حجمهای مختلف از محلولهای حاصل از شستشوی ستون *SPE* روی *E. coli ATCC25922*، *Staphylococcus aureus PTCC1431* و *Pseudomonas aeruginosa ATCC27853*..... ۶۳

۲.۳.۳ تأثیر حجمهای مختلف از محلولهای حاصل از شستشوی ستون *SPE* بر باکتری بیماری زای گیاهی *Xanthomonas oryzea* ۶۵

۳.۳.۳ تأثیر حجمهای مختلف از محلولهای حاصل از شستشوی ستون *SPE* بر باکتریهای مفید خاک *Bacillus sp.* و *Rizobium cicil* ۶۶

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری ۶۸

۱.۴ شناسایی ژن ۶۹

۲.۴ روشهای استخراج سیکلوتیدها ۷۳

۳.۴ مطالعات انجام شده روی فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها ۷۴

۴.۴ پیشنهادها ۷۸

منابع ۷۹

فصل اول

مقدمه

۱.۱ پپتیدهای حلقوی طبیعی

پپتیدهای حلقوی در همه سلسله‌های موجودات بیان و در ریبوزم ساخته می‌شوند (شکل۱.۱)، اندازه آنها بین ۱۲ تا ۸۰ آمینواسید متفاوت است. بسیاری از این پپتیدها علاوه بر دارا بودن ساختار حلقوی سر - دم، شامل یک یا چند پیوند دی- سولفید نیز هستند. ویژگی‌های عمومی آنها پایداری استثنایی در برابر عوامل شیمیایی و حرارتی است و در سیستم دفاعی موجود میزبان نیز نقش دارند. پپتیدهای حلقوی به دلیل پایداری منحصر به فرد خود می‌توانند در محیط‌های بیولوژیک بسیار سخت فعال بمانند به همین دلیل کاندیداهای مناسبی برای طراحی دارو هستند.

پپتیدهای ضد میکروبی یک نوع عمومی سیستم دفاعی ذاتی در همه اشکال حیات هستند که در موجودات زنده از باکتری‌ها تا گیاهان، بی مهرگان مهره دارن و انسان وجود دارند. پپتیدهای ضد میکروبی بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی را تشکیل می‌دهند که سیستم دفاعی اصلی برای اکثریت موجودات است. پپتیدهای ضد میکروبی در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها، بعضی انگل ها و ویروس‌ها فعالیت ضد میکروبی نشان می‌دهند اما ممکن است اهمیت این فعالیت‌ها در دفاع از میزبان، بین موجودات مختلف یا حتی در بخش‌های مختلف درون یک موجود، متفاوت باشد. پپتیدهای ضد میکروبی ممکن است به طور دائم بیان شوند یا اینکه در شرایط خاص و در پاسخ به عامل بیماری زا تولید شوند (موسوی نژاد و همکاران ۱۳۹۰)

۱.۱.۱ پپتیدهای حلقوی در گیاهان

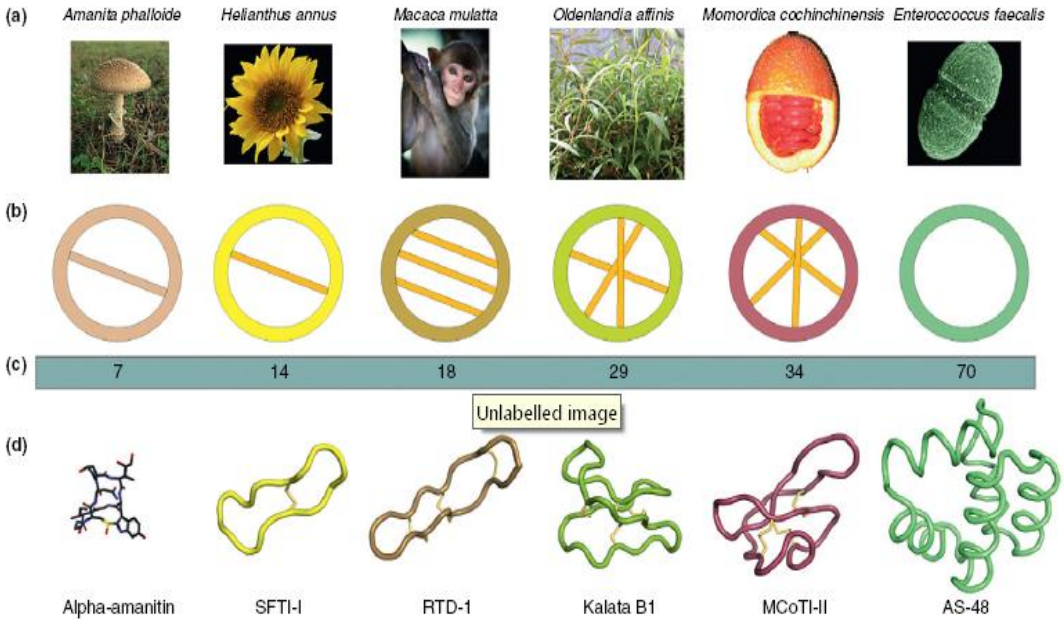
پپتیدهای حلقوی در گیاهان را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد:

۱. بازدارنده‌های تریپسین آفتابگردان

۲. سیکلوتیدها

بازدارنده تریپسین آفتابگردان (*STFI-1*) یک پپتید ۱۴ آمینواسیدی و واجد یک پیوند دی سولفیدی است که از دانه گیاه آفتاب گردان جدا شده و توانایی بازدارندگی تریپسین را دارد. سیکلوتیدها بزرگترین دسته پپتیدهای حلقوی گیاهی هستند و در بیش از ۲۰ گونه از خانوادههای *Violaceae* ، *Rubiaceae* ، *Cucurbitaceae* و *Fabaceae* گزارش شدهاند (*Thorstholm and Craik., 2011*) .

گروه دیگری از ترکیبات ضد میکروبی گیاهان پپتیدهای کوچکی هستند که تعداد زیادی پیوند



شکل ۱.۱. پپتیدهای حلقوی طبیعی. (*a*) نام و تصویر موجوداتی که پپتیدهای حلقوی در آنها بیان میشود. (*b*) نمای شماتیک بک بن حلقوی و اتصالات درون مولکولی شامل پیوندهای دی سولفید نشان داده شده است. آرایش سه پیوند دی سولفید در *kalata B1* و *MCoTI-II* به فرم سیستین نوت است ولی در *RTD-1* به فرم سیستین لدر است. شایان ذکر است که *alpha-amanitin* پیوند دی سولفید ندارد ولی به جای آن اتصالات کووالانسی بین سیستئین و تریپتوفان دارد. (*c*) تعداد آمینواسیدها در بک بن حلقوی را نشان میدهد. (*d*) شمای سه بعدی ریبون پپتیدهای حلقوی انتخاب شده را نشان میدهد (*Thorstholm and Craik., 2011*)

دی سولفیدی دارند. *Broekaert* در سال ۱۹۹۷ این پپتیدها را بر اساس شباهت توالی، پیوندهای دی سولفید و ویژگی‌های ساختاری به ۵ خانواده بزرگ تقسیم کرده است. این گروه از پپتیدهای *Knottin-type* بر خلاف سیکلوتیدها، ساختار غیرحلقوی دارند. مشخص ترین عضو این خانواده، پپتیدهای ضد میکروبی هستند که در دانه *Amaranthus caudatus* و *Mirabilis jalapa* تولید می‌شوند. این پپتیدها طیف وسیعی از بازدارندگی علیه قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت را دارند و فعالیت آنها با افزودن کاتیون‌های دو ظرفیتی متوقف می شود. برخلاف این پپتیدها سیکلوتیدها فعالیت ضد میکروبی وسیعی ندارند *(Gruber et al., 2007).*

۲.۱ ساختارها و فعالیت‌های پپتیدهای حلقوی طبیعی

پپتیدهای حلقوی طبیعی در ساختار و اندازه بسیار متفاوت هستند، کوچکترین آنها در قارچ‌ها شامل ۷ آمینواسید و بزرگترین آنها در باکتری‌ها شامل ۷۸ آمینواسید است (شکل ۱.۱). ولی ویژگی‌های عمومی متعددی در این پپتیدها وجود دارد از جمله ساختارهای کاملا معین، پایداری بسیار بالا و فعالیت‌های زیستی که نقش محوری در دفاع موجود میزبان دارند. دفاع میزبانی، در باکتری‌ها باعث محافظت باکتری در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها می‌شود و ایمنی قارچ‌ها و گیاهان را نسبت به مهاجم‌ها باعث می‌شود و جانوران را علیه بیماری‌ها مصون می‌کند *(Thorstholm and Craik., 2011)* .

۳.۱ سیکلوتیدها

آنچنان که اشاره شد سیکلوتیدها پپتیدهای حلقوی گیاهی هستند که تقریبا ۲۰۰ توالی از آنها تاکنون گزارش شده است *(http://www.cybase.orgaul)*، ولی پیش بینی می‌شود گروه

سیکلوتیدها بیش از ۱ ۰۰۰۰ عضو داشته باشد. اندازه آنها تقریبا ۳۷- ۲۸ آمینواسید است و سه پیوند دی سولفید آرایش سیستین نوت (*Cyctine Knot*) را ایجاد کرده‌اند (*Jennings et al., 2005*).

۱.۳.۱ تاریخچه کشف سیکلوتیدها

اکتشاف سیکلوتید *kalata B1* از کاربرد دارویی چای تهیه شده از گیاه *Oldenlandia affinis* توسط بومیان آفریقا الهام گرفته شده است، عصاره این گیاه به عنوان عامل منقبض کننده رحم جهت تسریع زایمان در سااال ۱۹۷۰ معرفی شد *(Ireland. et al.,2007)*. مشاهدات یکسانی نیز توسط *Gran* درباره زنان منطقه "زئیر" گزارش شد(*Gran. 1973*). طولی نکشید که تا سال ۱۹۹۵ پپتیدهای *uterotonic* زیادی با ساختار مشخص که شامل اسکلت حلقوی و به خصوص موتیف سیستین نوت بود، گزارش شد. علی‌رغم اینکه محتوای اسیدآمینه‌ای *kalataB1* شناسایی شده بود ولی تعیین توالی آن مشکل بود، زیرا هر دو انتهای آمینی و کربوکسیلی آن مسدود بود. ۲۰سال طول کشید تا ساختار سیکلوتیدها با استفاده از *NMR* تعیین گردد (*Henriqes and Craik D.J., 2010*). در سال۱۹۹۹، ۲۰ پپتید حلقوی دیگر کشف شد و اصطلاح سیکلوتید (*cyclic peptide*) در همین زمان رایج شد (*Daly et al., 2009*).

غلظت نسبتا بالای سیکلوتید در بافت گیاهی و حضور ایزوفرم‌های متعدد در یک گیاه به تناسب تفاوت‌های فصلی و منطقه‌ای پیشنهاد می‌کند که سیکلوتیدها در گیاه نقش دفاعی دارند (*Pra¨nting et al., 2010*).

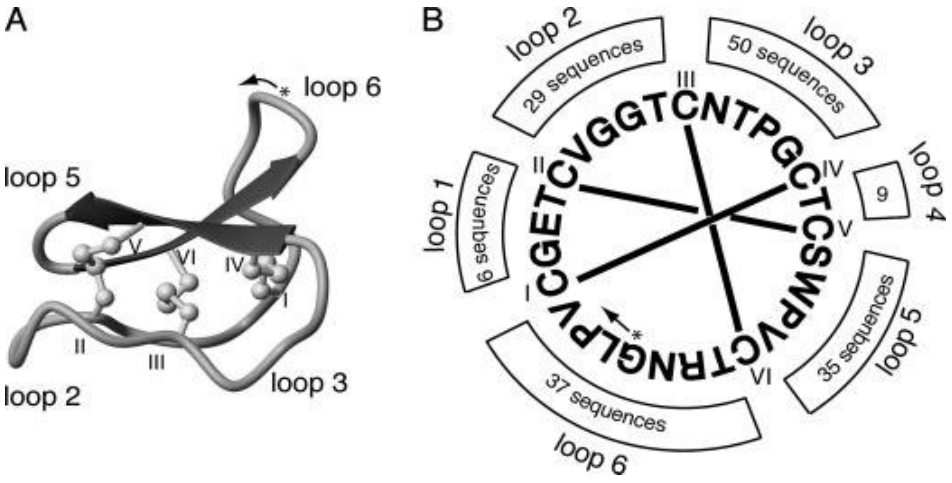
سیکلوتیدها شامل ۶ لوپ بین ۶ اسید آمینه حفاظت شده سیستئین هستند که *cystine knot* را تشکیل می دهند (شکل۲.۱). سیکلوتیدهای شناخته شده بر اساس شباهت توالی و

فاکتورهای توپولوژیکی به دو زیر خانواده اصلی تقسیم می شوند. این تقسیم بندی بر اساس حضور یا غیاب اسید آمینه سیس- پرولین در لوپ ۵ است. به طوری که حضور پرولین دلالت بر زیر خانواده *mobius* دارد (شکل ۲.۱) و غیاب آن سیکلوتیدهای *bracelet* را باعث می-شود. اگرچه حضور و عدم حضور *cis-Prolin* ویژگی دو زیر خانواده را نشان می‌دهد ولی همچنین تمایل به شباهت بالای توالی برای لوپ های مختلف زیر خانواده‌ها را با وجود تفاوت بین آنها آشکار می‌سازد. البته تقسیم بندی در این زیرگروه‌ها با ظهور سیکلوتیدهای سنتزی مبهم شده است، چرا که ساختار و عملکرد آنها ترکیبی از ویژگی های سیکلوتید *mobius* و *bracelet* است. زیرخانواده کوچکتر سوم سیکلوتید بازدارنده تریپسین یا *cyclic knottin* است، که تقریبا نسبت به *mobius* و *bracelet* متفاوت است و همچنین شامل موتیف *CCK* است. دو عضو این زیرخانواده همولوژی توالی کمی با اعضای سایر زیرخانواده‌ها دارند.

۲.۳.۱ مشخصات خانواده بنفشه *(Violaceae)* به عنوان یکی از منابع سیکلوتیدها

خانواده *Violaceae* از ۲۲ جنس و حدود ۹۰۰ گونه تشکیل شده است که همه جا زی (*Cosmopolitan*) بوده و عمدتا در مناطق معتدل متمرکز شده است. جنس بنفشه (*Viola*) شامل گونه هایی یکساله یا چندساله علفی یا درختچه‌ای می‌باشد. برگ‌ها متناوب دندانه ای یا لوب دار، یا به ندرت متقابل و دارای گوشوارک مشخص و گاهی برگ مانند. گل‌ها نا منظم، گاهی خودبارور اجباری، منفرد یا مجتمع در گل‌آذین خوشه یا سنبله، نر- ماده یا تک جنس، ، دم‌گل عمدتا واجد برگه، کاسبرگ‌ها ۵ عدد، تقریبا یکسان، در قاعده توسعه یافته و زایده کاسبرگی را ایجاد می کنند. گلبرگ‌ها نیز ۵ عدد بوده، نا برابر، پایینی‌ها اغلب مشخصا بزرگ و در قاعده واجد نوش‌جای یا مهمیز می‌باشند. پرچم‌ها به تعداد ۵ عدد، جدا از هم یا متصل با

بساکی چسبیده یا نیمه چسبیده. خامه در انتها متورم، کلاله به اشکال متنوع. میوه کپسول، سه خانه و شکوفا. گونه های مختلف این جنس در بسیاری موارد با همدیگر تلقیح و ایجاد هیبریدهای گوناگونی می‌نمایند (خاتم ساز۱۳۶۹). جنس ویولا با حدود ۲۰ گونه در نواحی مختلف ایران مخصوصا شمال ایران متمرکز شده است.



شکل ۲.۱. توالی و ساختار *Kalata B1*. (*A*) نمودار ریبون *Kalata B1* (*B*) نمای شماتیک توالی و پیوندهای دی سولفید *kalata B1* (*Simonsen et al., 2008*).

همه گونه‌های بررسی شده خانواده بنفشه حاوی سیکلوتید بوده‌اند. اما گونه‌های بررسی شده خانواده روناس (*Rubiaceae*) ۵-۱۰٪ سیکلوتید دارند (*Daly et al., 2009*). مطالعات نشان داده است تنها یک گونه از خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) حاوی سیکلوتید است.

۳.۳.۱ فعالیت‌های زیستی سیکلوتیدها

فعالیت ذاتی سیکلوتید در میزبان گیاهی، دفاع در مقابل آفات و پاتوژنها است. برخی فعالیت-های زیستی سیکلوتید به طور گسترده بررسی شده است که شامل *anti-HIV* ، ضد تومور،

سمیت، حشره کش، ضد میکروب و فعالیت همولیتیک است که در ادامه به برخی از آنها پرداخته خواهد شد (*Pra¨nting et al., 2010*).

۱.۳.۳.۱ فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها

فعالیت ضد میکروبی *cyO2*[1] استخراج شده از نمونه *Viola odorata* به وسیله ترکیبات محیط تحت تأثیر قرار می‌گیرد، به طوری که در محیط غنی یا حاوی نمک فعالیت کمتری دارد. نکته قابل توجه این است که *Staphylococcus enterica serovar Typhimurium LT2* کمترین حساسیت را بین باکتری های گرم منفی آزمایش شده دارد. بعضی از این سویه ها یک مسیر ژنتیکی دارند که می توانند بار منفی کمتری را در غشای خارجی خود تولید کنند. این در حقیقت باعث افزایش مقاومت به پپتیدها با بار مثبت می‌شود، چون تمایلات الکترواستاتیک در غشای باکتری کم می‌شود. تفاوت حساسیت باکتری های گرم منفی احتمالا به دلیل توانایی آنها در تغییر بار غشا در محیط است. *S. enterica serovar Typhimurium LT2* با کمترین حساسیت توانایی بالایی در کنترل این مکانیسم دفاعی دارد. یک مثال از مسیر مقاومت سیستم دو جزئی *PhoP-PhoQ* است که با غلظت خارج سلولی Mg^{2+} کنترل می-شود. فعال سازی این سیستم منجر به القا سیستم سیگنالی *PmrA- PmrB* می‌شود. این سیستم مسئول فعال سازی مسیر ادغام ۴- آمینو آرابینوز به لیپوپلی ساکارید است و بار منفی کمتری را در غشا تولید می‌کند. این آزمایشات در غلظت کم Mg^{2+} انجام شده است، شرایطی که لازم است تا سیستم *PhoP-PhoQ* را فعال کند. موتانت *pmrB* سالمونلا که تصور می-شود مسیر ۴- آمینو آرابینوز غیر وابسته به *PhoP–PhoQ* دارد، مانند سویه های وحشی در

[1] *Cycloviolacin O2*

محیط غنی از منیزیم به *cyO2* حساس است. این نشان می‌دهد که این سیستم در سویه‌های وحشی به دلیل غلظت پایین منیزیم محیط بیان می‌شود.

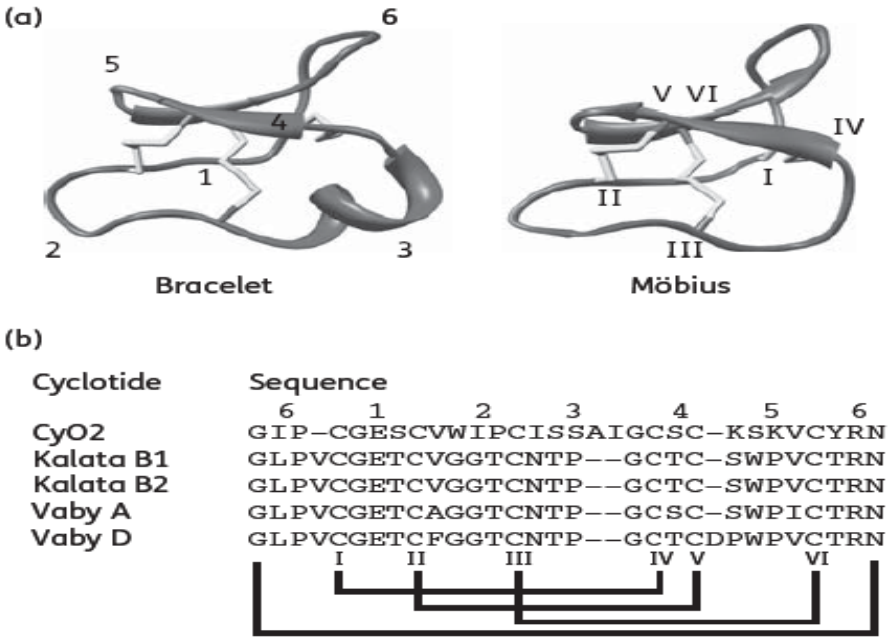
مطالعات در مورد اثر سیکلوتیدها بر کپسول نشان می‌دهد، تفاوت معنی داری در حساسیت سویه‌های تولید کننده کپسول و بدون کپسول *Klebsiella* وجود ندارد، هرچند مطالعات دیگر نشان داده‌اند که حساسیت به *AMPs*[۲] در سویه‌های بدون کپسول بیشتر است. *Llobet* و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که پوسته آنیونی کپسول پلی ساکاریدی به عنوان یک تله علیه *AMPs* عمل می‌کند و از اثر ضد میکروبی آن جلوگیری می‌کند. ممکن است عدم تفاوت در وجود کپسول به این دلیل باشد که *cyO2* با پوسته پلی ساکاریدی واکنش نمی‌دهد و به طور مؤثری کپسول را سوراخ می‌کند.

مخفی کردن آمینواسیدهای باردار در سطح سیکلوتیدها اثر شگرفی بر فعالیت ضد میکروبی آنها دارد. نقصان فعالیت در اثر پنهان شدن بار مثبت (دو لایزین یا آرژنین) مؤید این نظریه است که مکانیسم عمل *cyO2* به واسطه تخریب غشای سلول است. ارتباط اولیه بین *AMPs* و باکتری‌ها عموما به واسطه نیروهای الکترواستاتیک بین غشای سلول یا دیواره سلولی و پپتید رخ می‌دهد. به نظر می رسد بار مثبت برای میان‌کنش با باکتری‌ها نسبت به سلول های سرطانی با اهمیت‌تر است، چراکه *cyO2* که آرژنین آن تغییر یافته است اثر مشابهی را با *cyO2* طبیعی علیه دودمان سلولی لیمفوما انسانی دارد. بار مثبت همچنین برای فعالیت ضد کرم *cyO2* نیز اهمیت دارد.

طبق فرضیه بالا مخفی کردن گلوتامیک اسید باید منجر به فعالیت بیشتر به دلیل میان‌کنش قوی‌تر با غشا سلول شود، چراکه بار منفی حذف شده است و بار کلی پپتید مثبت‌تر شده است

[2] *Antimicrobial Peptides*

ولی این اتفاق نمی‌افتد پنهان کردن گلوتامیک اسید تقریبا باعث از دست رفتن فعالیت می‌شود. این مکانیسم، با تخریب درون مولکولی به جای میانکنش بین مولکولی توضیح داده می‌شود. آمینواسید گلوتامیک اسید بین سیکلوتیدها حفاظت شده است و در همه سیکلوتیدهایی که تا کنون جدا شده‌اند دیده شده است. به نظر می رسد این آمینواسید برای فعالیت‌های مختلف سیکلوتیدها مهم است. در سیکلوتیدهای *bracelet* مثل *cyO2* آمینواسید گلوتامیک نقش کلیدی را در ساختار بازی می‌کند. به دلیل هماهنگی با مجموعه پیوندهای هیدروژنی در لوپ ۳ هیدروفوب و آلفا هلیکس، (شکل ۳.۱) و این میان‌کنش در آنالوگ‌های متیله شده تخریب



شکل ۳.۱ ساختار و توالی سیکلوتیدهای *mobius* و *bracelet*. (*a*) ساختار سیکلوتید تیپیک *bracelet* (*cyO2; PDB 2KNM*) و *mobius* (*kalata B1; PDB ,1PT4*). سیستئین های حفاظت شده از شماره ۱ تا ۶ لوپ ها را تشکیل می دهند (اتصال *I*-*IV*، II-*V* و III-*VI*). (*b*) توالی *cyO2* و چهار سیکلوتید *mobius* دیگر. ویژگی *mobius* حضور *Cis- Prolin* در لوپ ۵ است، در حالیکه *bracelet* این ویژگی را ندارند (*Pra¨nting et al., 2010*).

شده است. به علاوه گفته می‌شود گلوتامیک اسید پایدارکننده ساختار سیکلوتید است و اجازه می‌دهد سیکلوتیدها به طور مؤثری در غشا تجمع یابند.

بدون شبکه پایدار پیوندهای هیدروژنی، قطعات هیدروفوبیک سطحی نامنظم هستند و این منجر به کاهش میانکنش با غشا سلول هدف می‌شود و بنابراین فعالیت را پایین می‌آورد (*Pra¨nting et al., 2010*).

در تحقیقی که به وسیله *Tam* و همکاران در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت چهار سیکلوتید کاملا به روش شیمیایی سنتز شدند و فعالیت آنها علیه باکتری‌های مختلف (چهار گرم منفی و دو گرم مثبت) با استفاده از *RDA*[۳] بررسی شد. سیکلوتیدهای سنتزی شامل *kalata B1* است که علیه باکتری های گرم مثبت مثل *Staphylococcus aureus* در غلظت‌های زیر میکرومولار فعال است، ولی علیه باکتری های گرم منفی نسبتاً غیر فعال است. برخلاف این نتیجه *Gran* و همکاران در سال ۲۰۰۸ *kalata B1* طبیعی را پیدا کردند که علیه *S. aureus* غیر فعال است، ولی علیه سویه های گرم منفی فعال است، ممکن است سیکلوتیدهای سنتزی که توسط *Tam* و همکاران بررسی شده‌اند ویژگی های متفاوتی نسبت به سیکلوتیدهایی که مستقیماً از گیاه استخراج می‌شوند داشته باشد، این مسئله ممکن است، به دلیل تفاوت در ساختار یا ارتباط پل‌های دی- سولفیدی، یا به دلیل تفاوت در حساسیت سویه‌های *S. aureus* استفاده شده در تحقیقات آنها باشد بنابراین می‌توان صریحاً نتیجه گرفت که فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها وابسته به زمان و غلظت آنها است. این نتیجه غیرمنتظره نیست چرا که سیکلوتیدها غشا سلول را تخریب می‌کنند و تخریب غشا مکانیسم اصلی فعالیت همه *AMPs* به دست آمده از موجودات مختلف است. سیکلوتیدهای بررسی

[3] *Radial Difiussion Assay*