

اثر پتید اسیدی و آمیدی مشتق از پروتئین استئوکلین بر تشکیل نانوبلورهای های هیدروکسی آپاتیت

سمانه حسینی¹، حسین نادری منش^{1*}، شهاب فقیهی²

- 1- دانشجوی دکترا، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- استاد، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استادیار، بخش زیست مواد و مهندسی بافت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

* کدپستی 14115-175، تهران، ایران

naderman@modares.ac.ir, sfaghihi@nigeb.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/10/4، پذیرش: 91/11/12)

چکیده - هدف این پژوهش، یافتن ارتباط میان کارکرد و ساختار توالی پتیدی مشتق از استئوکلین در نتیجه تغییر یک گروه عاملی و تأثیر آن بر تشکیل نانوبلور هیدروکسی آپاتیت است. قطعه پتیدی شامل 13 اسید آمینه از پروتئین استئوکلین، بر اساس توانایی اتصال به کلسیم، الگوبرداری و به روش فاز جامد به دو صورت اسیدی و آمیدی ساخته شد. روش دورنگ‌نمایی دورانی برای بررسی ساختار و از میکروسکوپ الکترونی برای بررسی کارکرد پتیدهای ساخته شده استفاده شد. همچنین اثر سمیت پتیدهای ساخته شده بر سلول‌های استئوبلاستی ارزیابی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی بیانگر تشکیل نانوبلور هیدروکسی آپاتیت در حضور پتید آمیدی است؛ در حالی که ذرات فسفات کلسیم بی‌شکل در حضور پتید اسیدی تشکیل شده است. بررسی ساختار دوم با استفاده از طیف دورنگ‌نمایی دورانی، ساختار راندتصادفی فنر با بیضی واری مولی کمتر برای پتید آمیدی را تأیید کرد. بررسی اثر سمیت نشان داد که پتید آمیدی، رشد سلول‌های استئوبلاستی را به گونه‌ای چشم‌گیر افزایش می‌دهد. نتایج میکروسکوپ الکترونی و میزان رشد سلول‌های استئوبلاستی، تأیید کننده افزایش فعالیت زیستی توالی پتیدی در اثر تغییر گروه کربوکسیل به گروه آمیدی است. استفاده از پتیدهایی که توانایی تشکیل مینرال‌های هیدروکسی آپاتیت را دارند، به خاطر فعالیت زیستی بالا و همچنین زیست سازگاری دلخواه، می‌تواند در ترمیم بافت استخوان موفقیت‌آمیز باشد.

واژگان کلیدی: تقلید زیستی، هیدروکسی آپاتیت، آمیداسیون کربوکسیل انتهایی، معدنی شدن زیستی.

1- مقدمه

ساختارهای زیستی و کارکرد آن‌ها در طبیعت الهام گرفته و در ساخت سامانه‌های زیستی از اجزای سنتزی استفاده می‌کند [1]. مواد غیرآلی که به وسیله ارگانوسم‌های زیستی ساخته می‌شود، بیشتر ویژگی‌های ساختاری و

تقلید زیستی¹، از زمینه‌های مهم نانوزیست فناوری است که برای طراحی مواد و سامانه‌های کاربردی، از

1. Biomimetic

می‌دهد که توالی‌های غنی از اسیدهای آمینه اسیدی، توانایی تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت را دارند. همچنین، در سال‌های نزدیک، پپتیدهای مصنوعی که توانایی اتصال ویژه به هیدروکسی‌آپاتیت و تشکیل بلور را دارند عرضه شده و سازوکاری برای چگونگی کارکرد این پپتیدها پیشنهاد شده است [10-12]. برهم‌کنش یون‌های فسفات در پپتیدهای بدون جایگاه اتصال کلسیم و همچنین مکمل بودن ساختار پپتیدی با سطح ماده معدنی از سازوکارهای پیشنهاد شده در تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت است. با وجود بررسی‌های فراوان روی تشکیل بلور هیدروکسی‌آپاتیت و فرایند معدنی‌شدن زیستی، سازوکار دقیق این فرایند به‌ویژه نقش مولکول‌های زیستی، ناشناخته مانده است.

استئوکلسین از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی بافت استخوان است که توانایی ویژه برای اتصال به یون‌های کلسیم و نقش کلیدی در معدنی‌شدن و تشکیل بافت استخوانی دارد [13، 14]. بررسی‌های کریستالوگرافی با اشعه ایکس نشان داده است که استئوکلسین پروتئینی کروی با سه ماریپیج آلفا است که ماریپیج نخست، با مواد معدنی بافت استخوان برهم‌کنش دارد [15]. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که پروتئین‌های مختلفی بر پروتئین استئوکلسین اثر گذاشته و آن را به چندین قطعه پپتیدی تجزیه می‌کنند [16، 17]. این قطعات پپتیدی بررسی شده است اما اهمیت و نقش این پپتیدها در معدنی‌شدن زیستی همچنان مشخص نیست. از سوی دیگر، در زمینه طراحی پپتید، از روش‌های مختلفی مانند مدیفیکاسیون توالی برای تعیین ارتباط کارکرد و ساختار استفاده می‌شود [18]. روش مدیفیکاسیون توالی مانند هر گونه تغییر در توالی پپتیدی طبیعی شامل حذف، اضافه یا جایگزین کردن اسید آمینه و یا گروه عاملی است. تغییر گروه کربوکسیل انتهایی به

مورفولوژیکی بهینه دارند و ساخت آن‌ها با روش‌های مصنوعی دشوار است. فراهم کردن شرایط زیستی مشابه برای تشکیل بلورهای معدنی می‌تواند به‌عنوان مدلی مناسب در طراحی و مهندسی مواد تقلیدشده زیستی، استفاده شود.

از ویژگی‌های اصلی معدنی‌شدن زیستی¹، استفاده از روش‌های پایین به بالا² است؛ در این روش‌ها، ساخت مواد از مقیاس‌های اتمی و مولکولی آغاز می‌شود و سبب تشکیل اجزای ساختمانی نانو ساختار شده و در نهایت به ساختارهای پیچیده سازمان‌دهی می‌شود [2]. اساس معدنی‌شدن زیستی، برهم‌کنش مولکول‌های زیستی و ماده معدنی است. مولکول‌های زیستی نقش مهمی در کنترل شکل و اندازه مواد معدنی تشکیل شده، دارند [3، 4]؛ همچنین، ویژگی‌های مکانیکی یگانه در بافت‌های معدنی‌شده از دیگر نقش‌های مولکول‌های زیستی است. تشکیل بافت استخوان³ نمونه‌ای از معدنی‌شدن زیستی است؛ در این فرایند، ماتریکس خارج سلولی شامل پروتئین‌هایی مانند استئوپوننتین، سیالوپروتئین و کلاژن نوع I با هیدروکسی‌آپاتیت برهم‌کنش داده و در هسته‌زایی، رشد و مورفولوژی بلور هیدروکسی‌آپاتیت نقش ایفا می‌کند [5، 6]. مطالعات معدنی‌شدن در آزمایشگاه، اطلاعات ارزشمندی درباره‌ی کارکرد پروتئین‌های اسیدی غیرکلاژنی⁴ فراهم کرده است [7]. برای نمونه، نتایج این پژوهش‌ها، اثر مهاری پروتئین استئوپوننتین و اثر افزایشی پروتئین‌های DMP1⁵ و BSP⁶ را بر تشکیل ماده معدنی استخوان تأیید می‌کند [8، 9]. بررسی‌هایی که روی بافت استخوان و تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت انجام شده، نشان

1. Biom mineralization
2. Bottom-up
3. Osteogenesis
4. None-collagenous proteins
5. Dentin matrix protein1
6. Bone sialoprotein

ساخت پپتید آمیدی و وانگ رزین³ برای سنتز پپتید اسیدی انتخاب شد. اسیدهای آمینه از انتهای آمینی به وسیله گروه Fmoc⁴ محافظت می شوند. نخستین اسید آمینه از انتهای کربوکسیلیک خود به رزین پیوند داده شده و سپس گروه Fmoc به وسیله 20 درصد پیریدین⁵ در دی متیل فرمامید⁶ جدا شده و اسید آمینه محافظت شده بعدی اضافه می شود. اتصال اسیدهای آمینه در حضور TBTU و N-اتیل ایزوپروپیل آمین⁷ انجام می شود. پپتید ساخته شده به وسیله ی مخلوط تری فلورو استیک اسید، آب و TIS⁸ (2/5 : 2/5 : 95) از رزین جدا و در دی اتیل اتر سرد، رسوب داده شد. پپتیدها به صورت دستی در ستون شیشه ای سنتز شده و درستی انجام اتصال پپتیدها با آزمون کلرانیل تأیید شد [19].

2-2- خالص سازی

پپتیدها با دستگاه HPLC (فارماسیا، آمریکا) روی ستون فاز معکوس C18 (Vaydoc) خالص شد. شستشوی ستون با شیب غلظتی استونیتریل (دارای 0/1 درصد تری فلورو استیک اسید) با سرعت جریان 3 میلی لیتر در دقیقه شست و شو شد و جذب آن در طول موج 215 نانومتر بررسی شد. آنالیتیکال HPLC، خلوص بیش از 95 درصد را برای پپتیدها تأیید کرد و وزن مولکولی آن ها به وسیله طیف سنجی جرمی تأیید شد.

3-2- مطالعات دورنگ نمایی دورانی (CD)

در این پژوهش طیف های CD به وسیله ی اسپکتروپلاریمتر جاسکو-810 (Jasco-810) ثبت شد. در این آزمایش ها

گروه آمیدی، از روش های متداول در مدیفیکاسیون توالی است که اثر آن در معدنی شدن زیستی بررسی نشده است.

در این بررسی، از قطعه پپتیدی 13 اسید آمینه ای که بخشی از توالی پروتئین استئوکلسین است برای تقلید زیستی، الگوبرداری شده است. این توالی می تواند به یون کلسیم وصل شود و بنابراین انتظار می رود باعث تشکیل هیدروکسی آپاتیت شود. هدف این پژوهش، بررسی ارتباط کارکرد و ساختار توالی پپتیدی در پی تغییر یک گروه عاملی و اثر آن بر معدنی شدن زیستی است. این رابطه و تأثیر آن بر فعالیت زیستی توالی الگوبرداری شده، با تغییر انتهای کربوکسیل توالی پپتیدی مورد نظر به گروه آمیدی تعیین شد. دورنگ نمایی دورانی¹ و میکروسکوپ الکترونی به ترتیب برای بررسی ساختار و بررسی تشکیل و یا عدم تشکیل هیدروکسی آپاتیت در حضور دو پپتید، استفاده شد. همچنین، اثر پپتیدهای ساخته شده بر سلول های استئوبلاستی برای بررسی سمیت آن ها ارزیابی شد. این بررسی برای ایجاد درک بهتر از ساز و کار تشکیل ساختار سخت استخوان و به دنبال آن، پیشرفت روش های تقلید زیستی برای ترمیم بافت سخت، طراحی و انجام شد.

2- مواد و روش ها

1-2- سنتز پپتید

توالی 13 اسید آمینه ای الگوبرداری شده از استئوکلسین به روش فاز جامد به صورت اسیدی و آمیدی سنتز شد. توالی اسیدهای آمینه پپتید ساخته شده به صورت LEPRREVCELNPD است. رزین رینک آمید² برای

3. Wang resin
4. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
5. Piperidine
6. Dimethylformamide
7. N-ethyl isopropylamine
8. Triisopropylsilane

1. Circular Dichroism
2. Rink amide MBHA resin

هیدروژن فسفات به ترتیب با غلظت‌های نهایی 3/3 میلی‌مولار و 1/6 میلی‌مولار به همراه 5 میکرولیتر از پپتید با غلظت اولیه 2 میلی‌گرم در لیتر روی گرید قرار داده شد و پس از 2 ساعت با کاغذ خشک‌کن، آب اضافی آن گرفته شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی با دستگاه FEI-Tecnai 12 در 120 kV مجهز به سامانه دوربین CCD گرفته شد.

2-6- بررسی اثر سمیت

برای بررسی اثر سمیت پپتیدهای ساخته شده، نخست، سلول‌های شبه استئوبلاستی (MG-63) در محیط DMEM با غلظت 100 واحد در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (اینویتروزن-آمریکا) و (5 درصد) 100 میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (اینویتروزن-آمریکا) و 10 درصد FBS در انکوباتور با CO₂ کشت داده شد. سپس تعداد 10⁴ سلول درون چاهک‌های بشقاب 96 خانه قرار داده شد. در زمان‌های 24 و 72 ساعت، محلول MTT را به چاهک‌ها اضافه کرده و پس از 4 ساعت با اضافه کردن DMSO و تشکیل رنگ بنفش، میزان رنگ تولیدشده در طول موج 540 نانومتر تعیین شد.

برای همه اندازه‌ها، محاسبات آماری شامل میانگین، واریانس و آزمون تی انجام شده و نتایج با سطح معنی‌دار کمتر از 0/05 گزارش شده است.

3- نتایج

3-1- سنتز پپتید

توالی پپتیدی الگوبرداری شده از پروتئین استئوکلسین، به دو شکل آمیدی و اسیدی به ترتیب با وزن مولکولی 1568/8 و 1569/7 به روش فاز جامد ساخته شد.

پارامتر بیضی‌واری مولی¹ در دامنه طول موجی مورد نظر اندازه‌گیری شد. بیضی‌واری مولی از رابطه زیر به دست آمد:

$$[\theta_\lambda] = \theta \times \frac{100MRW}{cl}$$

c، غلظت پپتید برحسب mg/ml، l، طول مسیر نور برحسب سانتی‌متر، θ ، بیضی‌واری مولی برحسب درجه در طول موج λ و MRW، میانگین وزن هر اسید آمینه است. کالیبراسیون دستگاه در (deg cm² dmol⁻¹) (dmol⁻¹) با $[\theta]_{290/5} = 7.910$ (+) کامفورسولفونیک اسید انجام شد.

2-4- اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه ذرات

میانگین اندازه پپتیدها با روش پراکندگی دینامیکی نور² (DLS) به وسیله دستگاه نانوزتا سایزر (مالورن-انگلیس) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به دست آمد. این دستگاه به نور لیزر هلیوم - نئون مجهز است. همچنین، پتانسیل زتای پپتیدها به وسیله همین دستگاه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با روش تحرک الکتروفورتیکی تعیین شد.

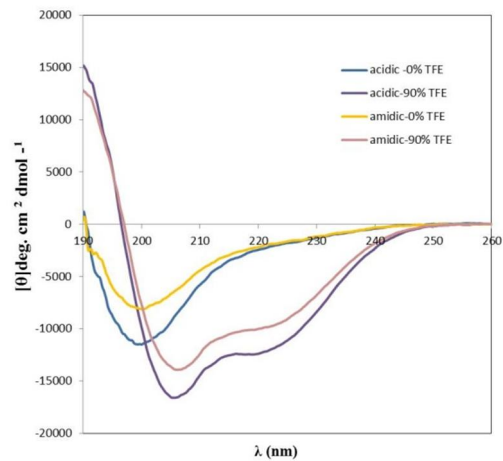
2-5- مطالعات میکروسکوپ الکترونی

تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت در حضور پپتیدهای ساخته شده، با میکروسکوپ الکترونی عبوری³ (TEM) بررسی شد. بدین‌گونه که تشکیل نانوبلورهای آپاتیت روی گریدهای TEM، انجام شد. 10 میکرولیتر شامل محلول‌های کلرید کلسیم و دی‌سدیم

1. Mollar ellipticity
2. Dynamic Light Scattering
3. Transmission Electron Microscope

3-2- مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی

برای بررسی ساختار دوم پیتیدها و تغییرات ساختاری پدید آمده در اثر تغییر گروه کربوکسیل در انتهای C، روش دورنگ‌نمایی دورانی استفاده شد. در شکل 1 طیف‌های CD دور پیتیدهای ساخته شده دیده می‌شود. از طیف دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور، نشان‌دهنده ساختار تصادفی کوپل برای هر دو پیتید است. ویژگی ساختار تصادفی کوپل، پیک منفی در 198-200 نانومتر مربوط به انتقال $\pi-\pi^*$ است [20]. همان‌گونه که دیده می‌شود، میزان بیضی‌واری برای پیتید آمیدی کاهش یافته است. همچنین ساختار پیتیدها در حضور تری‌فلورواتانول (TFE) برای بررسی توانایی پیتیدها در تشکیل ساختار دوم منظم، ارزیابی شد. تری‌فلورواتانول یک حلال آلی با توانایی القای ساختار دوم در پیتیدها است. همان‌گونه که دیده می‌شود، پیتیدها در حضور تری‌فلورواتانول، ساختار مارپیچ آلفا را نشان می‌دهند. دو پیک منفی در ناحیه 205-208 نانومتر و 218-222 نانومتر، ویژگی ساختار آلفا است [21].



شکل 1 طیف دورنگ‌نمایی دورانی از پیتیدهای اسیدی و آمیدی مشتق‌شده از پروتئین استوکلسین در آب و تری‌فلورواتانول 90 درصد

3-3- اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه ذرات

اندازه‌گیری پتانسیل زتا با بیان غیرمستقیم میزان بار سطحی، توانایی ارزیابی برهم‌کنش بارهای الکتروستاتیکی را فراهم می‌کند. نتایج پتانسیل زتا در این بررسی نشان‌دهنده میزان بار منفی 14/4- میلی‌ولت برای پیتید اسیدی و 6/59- میلی‌ولت برای پیتید آمیدی است (جدول 1). همچنین، میانگین اندازه ذرات برای پیتید اسیدی و آمیدی به ترتیب 444/7 و 450 نانومتر است که گویای تجمع پیتیدها در محلول است (جدول 1).

جدول 1 میانگین پتانسیل زتا و اندازه ذرات برای پیتید اسیدی و آمیدی

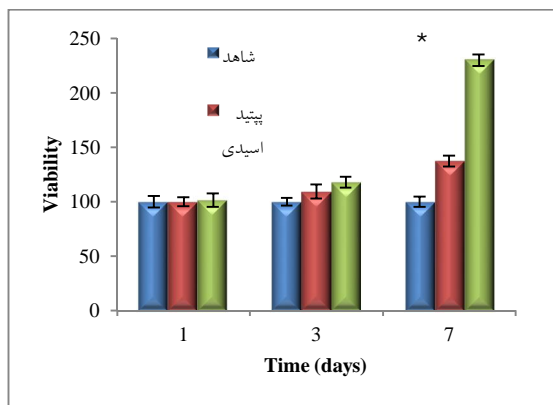
نمونه	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	اندازه ذرات (نانومتر)
پیتید اسیدی	-14/4±0/98	450/7±15/50
پیتید آمیدی	-6/59±1/22	447/7±19/48

3-4- بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی (TEM)

از میکروسکوپ الکترونی عبوری برای مقایسه اثر پیتیدهای سنتز شده بر تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت، استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت در حضور پیتید آمیدی تشکیل می‌شود (شکل 2). همان‌گونه که دیده می‌شود، نانوبلورهای صفحه‌ای شکل در حضور پیتید آمیدی پس از 2 ساعت تشکیل شده است. در حالی که بلور، روی نمونه شاهد و پیتید اسیدی تشکیل نشده است و نانوذرات بی‌شکل فسفات کلسیم دیده می‌شود. الگوی تفرق نانوبلورهای تشکیل شده در حضور پیتید آمیدی، بیانگر صفحه‌های 002، 211 و 004 به ترتیب با فاصله بین‌صفحه‌ای (d) 0/28، 0/35 و 0/17 نانومتر است، که منطبق بر فاصله صفحه‌ای در هیدروکسی‌آپاتیت است [22].

3-5- تست سمیت

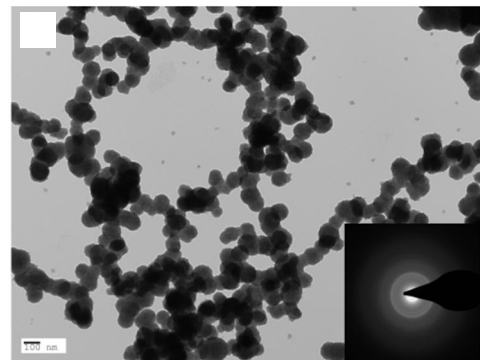
به خاطر کاربرد پیپتدهای ساخته شده در تشکیل بافت استخوان و استفاده در محیط *in vivo* سمیت این توالی‌ها برای سلول‌های استخوانی بررسی شد. نتایج این آزمایش در شکل 3 نشان داده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود، این پیپتدها نه تنها برای سلول‌های استئوبلاستی سمی نیست، بلکه میزان رشد آن‌ها را تا دو برابر افزایش داده است. همچنین، رشد سلول‌ها در حضور پیپتد آمیدی نسبت به پیپتد اسیدی به میزان چشم‌گیری بیشتر است ($p < 0/05$).



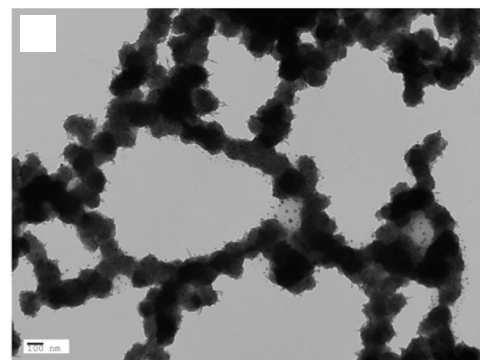
شکل 3 بررسی اثر سمیت پیپتدهای اسیدی و آمیدی مشتق شده از پروتئین استنوکلسین بر سلول‌های استئوبلاست

4- بحث و نتیجه گیری

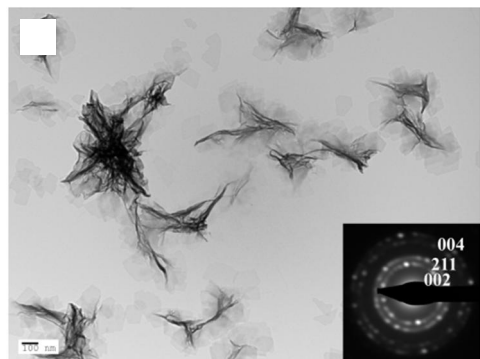
درک فرایندهای معدنی شدن زیستی و ارتباط ساختار و کارکرد در سطوح مولکولی می‌تواند گام بزرگی در راه ساخت مواد تقلیدشده زیستی برای ترمیم بافت استخوان باشد. با توجه به اهمیت مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها در این فرایند، استفاده از پیپتدهایی که می‌توانند معدنی شدن را افزایش دهند می‌تواند برای افزایش تشکیل بافت معدنی استخوان پیرامون کاشتنی‌ها و همچنین



(الف)



(ب)



(ج)

شکل 2 تصاویر میکروسکوپ الکترونی از تشکیل فسفات کلسیم در نمونه (الف) شاهد، (ب) پیپتد اسیدی (ج) پیپتد آمیدی بعد از 2 ساعت. فسفات کلسیم بی‌شکل در نمونه‌های شاهد و پیپتد اسیدی و بلورهای آپاتیت در نمونه پیپتد آمیدی دیده می‌شود.

قسمت‌هایی که نیاز به تشکیل بافت سخت دارند، مفید باشد. از سوی دیگر، طراحی و ساخت پیتیدها به خاطر مزایایی مانند فعالیت زیستی بالا، نداشتن عوارض جانبی و داشتن سمیت پایین و زیست‌سازگاری، در علوم زیستی و پزشکی بسیار مورد توجه است. بنابراین برای نخستین بار توالی پیتیدی الگوبرداری شده از پروتئین استئوکلسین که یکی از پروتئین‌های مؤثر بر معدنی شدن بافت استخوان است از دیدگاه ساختاری و کارکردی در تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت بررسی شد.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی، تشکیل نانوبلور هیدروکسی‌آپاتیت را در حضور پیتید آمیدی نشان می‌دهد. اگرچه تشکیل فسفات کلسیم بی‌شکل در حضور هر دو پیتید دیده می‌شود، اما نانوبلور هیدروکسی‌آپاتیت تنها در حضور پیتید آمیدی تشکیل شده است. بنابراین، پیتید در تشکیل فسفات کلسیم بی‌شکل نقشی ندارد و پیتید آمیدی سرعت تبدیل فسفات کلسیم بی‌شکل به بلور آپاتیت را افزایش می‌دهد. این تفاوت کارکرد را می‌توان نتیجه‌ی مدیفیکاسیون در توالی و ساختار پیتید الگوبرداری شده، دانست.

همان‌گونه که نتایج دورنگ‌نمایی دورانی نشان می‌دهد، ساختار تصادفی کویل در هر دو پیتید دیده می‌شود، اما میزان بیضی‌واری برای پیتید آمیدی کمتر است که اثر تغییر گروه کربوکسیل انتهایی به گروه آمیدی را نشان می‌دهد. همچنین، در حلال آلی تری‌فلورواتانول، در هر دو پیتید، انتقال ساختاری از کویل تصادفی به مارپیچ آلفا رخ داده است که نشان می‌دهد پیتیدهای سنتز شده از دیدگاه ساختاری انعطاف‌پذیر است و توانایی تغییر ساختار در شرایط مختلف را دارد. این ویژگی در پروتئین‌ها و پیتیدهایی که در معدنی شدن زیستی نقش دارند، دیده شده است [23، 24]. مدیفیکاسیون گروه

کربوکسیل به گروه آمیدی در تغییر بار سطحی دو پیتید نیز تفاوت چشم‌گیری ایجاد کرده است؛ به‌گونه‌ای که هر دو پیتید از دیدگاه اندازه و درجه تجمع، مقدار مشابهی را نشان می‌دهند. این در حالی است که تغییر در توالی، بار سطحی را به میزان دو برابر برای پیتید آمیدی کاهش داده است؛ به‌عبارتی پیتید آمیدی نسبت به پیتید اسیدی مثبت‌تر شده است. بنابراین انتظار می‌رود برهم‌کنش دو پیتید با یون‌های تشکیل‌دهنده هیدروکسی‌آپاتیت برای تشکیل بلور، متفاوت باشد.

بر اساس نتایج بررسی‌های دورنگ‌نمایی دورانی می‌توان گفت که مدیفیکاسیون در توالی پیتیدی مورد نظر موجب تغییر ساختار شده که افزایش کارکرد پیتید را به دنبال دارد. این نتیجه با مطالعات میکروسکوپ الکترونی تأیید شد. همان‌گونه که دیده می‌شود، تغییر گروه کربوکسیل به گروه آمیدی، فعالیت زیستی پیتید را افزایش داده است. این نکته قابل توجه است که پیتیدهای حاوی گروه آمیدی نسبت به پیتیدهای با انتهای اسیدی، فعالیت زیستی بیشتری دارد [25]. با توجه به میزان بار سطحی پیتیدها می‌توان پیشنهاد کرد که برهم‌کنش مؤثرتر یون‌های کلسیم و فسفات و پیتید آمیدی می‌تواند دلیل کارکرد متفاوت این پیتید در تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت باشد. از دیدگاه ترمودینامیکی، اتصال اختصاصی پیتید به یون‌های کلسیم و فسفات، انرژی گیبس پایین‌تری دارد که نیروی پیش‌برنده‌ای برای رشد و هسته‌سازی فازهای غیرآلی ویژه فراهم می‌کند [26].

بررسی سلول‌های استئوبلاست، افزایش رشد در حضور پیتید آمیدی را نشان می‌دهد. اگرچه هر دو پیتید اسیدی و آمیدی، نبود سمیت و افزایش رشد سلول‌های استئوبلاستی را سبب می‌شوند، اما افزایش فعالیت زیستی پیتید آمیدی نسبت به پیتید اسیدی کاملاً نمایان است. این

- (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*. 381, 56-58
- [4] Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996) Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*. 271, 67-69
- [5] Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C., and Goldberg, H. A. (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* 317, 59-64
- [6] Young, M. F., Kerr, J. M., Ibaraki, K., Heegaard, A. M., and Robey, P. G. (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 281, 275-294
- [7] Goldberg, H. A., Warner, K. J., Li, M. C., and Hunter, G. K. (2001) Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect. Tissue Res.* 42, 25-37
- [8] He, G., Dahl, T., Veis, A., and George, A. (2003) Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat. Mater.* 2, 552-558
- [9] Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem. J.* 302, 175-179
- [10] Roy, M. D., Stanley, S. K., Amis, E. J., and Becker, M. L. (2008) Identification of a highly specific hydroxyapatite-binding peptide using phage display. *Adv. Mater.* 20, 1830-1836
- افزایش فعالیت، مربوط به گروه آمیدی در توالی سنتز شده است. به نظر می رسد افزایش بار سطحی مثبت که به خاطر مدیفیکاسیون در توالی پپتیدی ایجاد می شود، نفوذپذیری سلولها را برای ورود بیشتر فاکتورهای مؤثر در رشد، افزایش داده است. بررسی های پیشین گویای آن است که پپتیدهای کاتیونی، نفوذپذیری سلولها را افزایش می دهند [27، 28]. برهم کنش بارهای مثبت پپتیدهای کاتیونی با بار منفی فسفولیپیدهای غشای سلولی، باعث به هم خوردن نظم طبیعی دو لایه فسفولیپیدی غشای شده و با تشکیل میسل های وارونه، موجب افزایش نفوذپذیری سلول می شود [29].
- به طور خلاصه در این بررسی مشخص شد که توالی پپتیدی الگوبرداری شده از استئوکلسین با مدیفیکاسیون از حالت اسیدی به آمیدی، تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت را افزایش می دهد. شواهد نشان می دهند که جایگزینی گروه کربوکسیل با گروه آمیدی در توالی پپتیدی، تغییر ساختار و در نتیجه کارکرد متفاوت پپتیدها را به دنبال دارد. بررسی بیشتر در زمینه ساختاری می تواند درک سازوکار مولکولی تشکیل بلور آپاتیت را آسان تر کند.

5- منابع

- [1] Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K., Schulten, K., and Baneyx, F. (2003) Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat. Mater.* 2, 577-585
- [2] Beniash, E. (2011) Biomaterials-hierarchical nanocomposites: The example of bone. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3, 47-69
- [3] Belcher, A. M., Wu, X. H., Christensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E.

- comparison of mu-selective endomorphin-2 with its C-terminal free acid, studied by 1H-NMR spectroscopy, molecular calculation, and X-ray crystallography. *Febs J.* 272, 5079-5097
- [19] Vojkovsky, T. (1995) Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.* 8, 236-237
- [20] Kulp, J. L., Shiba, K., and Evans, J. S. (2005) Probing the conformational features of a phage display polypeptide sequence directed against single-walled carbon nanohorn surfaces. *Langmuir.* 21, 11907-11914
- [21] Juban, M. M., Javadpour, M. M., and Barkley, M. D. (1997) Circular Dichroism Studies of Secondary Structure of Peptides. *Methods Mol. Biol.* 78, 73-78
- [22] Vali, H., McKee, M. D., Çiftçioglu, N., Sears, S. K., Plows, F. L., Chevet, E., Ghiabi, P., Plavsic, M., Kajander, E. O., and Zare, R. N. (2001) Nanoforms: A new type of protein-associated mineralization. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 65, 63-74
- [23] Atkinson, R. A., Evans, J. S., Hauschka, P. V., Levine, B. A., Meats, R., Triffitt, J. T., Viridi, A. S., and Williams, R. J. (1995) Conformational studies of osteocalcin in solution. *Eur. J. Biochem.* 232, 515-521
- [24] Delak, K., Collino, S., and Evans, J. S. (2009) Polyelectrolyte domains and intrinsic disorder within the prismatic Asprich protein family. *Biochemistry.* 48, 3669-3677
- [25] Strandberg, E., Tiltak, D., Ieronimo, M., Kanithasen, N., Wadhvani, P., and Ulrich, A. S. (2007) Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of
- [11] Segvich, S. J., Smith, H. C., and Kohn, D. H. (2009) The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. *Biomaterials.* 30, 1287-1298
- [12] Shiba, K. (2010) Natural and artificial peptide motifs: their origins and the application of motif-programming. *Chemical Society Reviews.* 39, 117-126
- [13] Aarden, E. M., Wassenaar, A. M., Alblas, M. J., and Nijweide, P. J. (1996) Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes. *Histochem. Cell Biol.* 106, 495-501
- [14] Delmas, P. D., Eastell, R., Garnero, P., Seibel, M. J., and Stepan, J. (2000) The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos. Int.* 11 Suppl 6, S2-17
- [15] Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J., and Yang, D. S. C. (2003) Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 425, 977-980
- [16] Garnero, P., Grimaux, M., Seguin, P., and Delmas, P. D. (1994) Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 9, 255-264
- [17] Novak, J. F., Hayes, J. D., and Nishimoto, S. K. (1997) Plasmin-mediated proteolysis of osteocalcin. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1035-1042
- [18] In, Y., Minoura, K., Tomoo, K., Sasaki, Y., Lazarus, L. H., Okada, Y., and Ishida, T. (2005) Structural function of C-terminal amidation of endomorphin. Conformational

- [28] Ziegler, A. (2008) Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 580-597
- [29] Derossi, D., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8, 84-87
- cationic α -helical peptides. *Pure Appl. Chem.* 79, 717-728
- [26] Baneyx, F., and Schwartz, D. T. (2007) Selection and analysis of solid-binding peptides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 312-317
- [27] Hoyer, J., Schatzschneider, U., Schulz-Siegmund, M., and Neundorff, I. (2012) Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery. *Beilstein J. Org. Chem.* 8, 1788-1797