

طراحی نظری به کمک پتانسیل نیروی میانگین و بررسی تجربی یک جهش جدید در پپتید Cap37 به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی آن

مهری هدایتی^۱، کریم مهنام^۲، بهناز صفار^{۳*}

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

*شهرکرد، ایران

saffar_b@@sku.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۷

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

چکیده

افزایش مقاومت باکتری‌ها به علت مصرف بی‌رویه پادزیست‌ها مشکل آینده بشریت است که می‌تواند منجر به بحران و همه‌گیری‌های وسیع در سطح جهان شود. به نظر می‌رسد ترکیبات ضدباکتری طبیعی مثل پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونیک اهمیت ویژه‌ای دارند و امکان مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به آنها کمتر است. Cap37 یا آزروسیدین پروتئینی است که از گرانول‌های نوتروفیل انسانی جداسازی شده و به عنوان یک پادزیست طبیعی عمل می‌کند. باقیمانده‌های ۴۴-۲۰ پروتئین Cap37 خاصیت ضدباکتریایی دارد. در این مطالعه برای افزایش خاصیت ضدباکتریایی این پپتید دو جهش در پپتید مذکور طراحی شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدها در آب به مدت ۵۰ نانوثانیه و همچنین شبیه‌سازی عبور پپتیدها از غشا لیپید A به عنوان مدل غشا باکتری‌ها با روش نمونه‌برداری چتری با هدف محاسبه پتانسیل نیروی میانگین انجام شد. نتایج نظری نشان داد که پپتیدی که حاوی ترادف SWRW است نسبت به پپتید طبیعی که حاوی ترادف (SQRS) یا جهش دیگر که حاوی ترادف WWRS است تمایل کمتری برای رسوب و تمایل بیشتری برای عبور از غشا دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که Cap37 با جهش SWRW فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به پپتید طبیعی دارد. برای تایید نتایج نظری به دست آمده پپتید طبیعی و جهش یافته SWRW ساخته شد. نتایج آزمون MIC نشان دهنده خاصیت ضدباکتریایی پپتید مذکور بر روی

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، باز نشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

تعدادی باکتری گرم منفی و گرم مثبت از قبیل *اشرشای کلائی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتلیس* بود و نتایج نظری را تایید کرد.

کلید واژگان: پپتیدهای ضد میکروبی، پپتید جهش یافته، پروتئین CAP37، شبیه سازی دینامیک مولکولی، آزمون MIC

۱- مقدمه

گلوبول های سفید دارای طیفی از پپتیدها و پروتئین های ضد میکروبی هستند که به آنها در حمله ی تخریبی به باکتری ها کمک می کند. این مولکول های پادزیست داخلی به دلیل تنوع در ساختار و سرعت عمل و نحوه ی تعامل آنها با موجود زنده هدف مورد توجه قرار گرفته اند. چهار پروتئین که از گرانول های آزروفیل نوتروفیل های انسانی جدا سازی شده، شامل Cathapsin ، Defensins ، Cap37/Azur ، G و BPI/Cap57/BP می باشند. Cap37 یا آزروسیدین یک عامل کموتاکسی خاص برای مونوسیت ها است و احتمالاً یک نقش اساسی در هجوم مونوسیت ها در فرایند التهاب دارد [۱].

آزروسیدین که به نام های پروتئین کاتیونیک ضد میکروبی ۳۷ کیلو دالتونی (Cap37) یا پروتئین متصل شونده به هپارین نیز شناخته می شود، از گرانول های آزروفیل نوتروفیل انسان ترشح می شود. Cap37 شامل کاتاپسین G و نوتروفیل الاستاز (NE) و پروتئاز ۳ (PR3) می باشد. گرانول های آزروفیل که خاص لیزوزوم های نوتروفیل است شامل حداقل ۱۰ پروتئین با خاصیت ضد باکتری می باشد. پروتئین Cap37 یک پروتئین تک رشته ای شامل ۲۲۲ آمینواسید است. این پروتئین ۳ جایگاه N گلیکوزیده دارد که در موقعیت آسپارژین ۱۰۰ و ۱۱۴ و ۱۴۷ می باشد. این پروتئین دومین های مختلفی دارد. باقیمانده های ۲۰ تا ۴۴ دارای خاصیت پادزیستی و اندوتوکسینی می باشند. به تازگی، مشخص شده است که CAP37 فعالیت چندگانه ای را در سلول های میزبان تنظیم می کند که شامل هم می شود. دومینی که این عملکردها و فعالیت بیوسنتزی

پپتید را مشخص می کند و خاصیت اتصال به غشا لیپوساکاریدی باکتری (LPS) را دارد بین باقیمانده های ۱۲۰ تا ۱۴۶ می باشد. این دومین خاصیت ضد باکتری خیلی بالایی دارد و در ترمیم زخم نیز شرکت می کند [۲، ۳]. در واقع Cap37 به عنوان یک پروتئین چند کاره شناخته می شود که دارای فعالیت ضد باکتریایی است و سبب کموتاکسی مونوسیت ها می شود و علاوه بر فعالیت به عنوان یک واسطه ی التهابی، در ترمیم زخم نیز مشارکت دارد. [۴].

Cap37 از گرانول های آزروفیل نوتروفیل ترشح می شود که می تواند روی پروتئوگلیکان سطح سلول های اندوتلیال تجمع یابد. پروتئین آزروسیدین موجود بر روی پروتئوگلیکان مونوسیت ها را به وسیله ی افزایش حرکت کلیسم داخل سلولی فعال می کند که در نهایت سبب می شود اتصال مونوسیت ها به سلول های اندوتلیال افزایش یابد. آزروسیدین در طی جراحات و عفونت بافت ها از نوتروفیل ها آزاد می شوند که می تواند یک کموتاکسی برای مونوسیت ها و ماکروفاژها باشد. این پروتئین آزاد سازی سایتوکاین های $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ از ماکروفاژها را نیز القا می کند [۵].

بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی به صورت طبیعی فعالیت کافی نداشته و باید پیش از استفاده از آنها به عنوان عوامل درمانی، بهینه سازی شوند. بنابراین، از روش هایی مانند جهش زایی تصادفی به عنوان روش متنوعی برای بهینه سازی این پپتیدها استفاده شده است.

شبیه سازی مولکولی یکی از روش های نظری و محاسباتی بررسی میانکنش پپتیدهای ضد باکتری با غشا

باکتری و بررسی اثر پادزیستی آنها در سطح اتمی است [۶].

از آنجا که کارایی عوامل ضدباکتری بستگی به میانکنش آنها با غشا باکتری دارد، هدف از این پژوهش شبیه سازی دینامیک مولکولی میانکنش پپتید Cap37 با مدل غشا باکتری و طراحی جهش هایی که منجر به افزایش خاصیت ضد میکروبی آن شود، می باشد. همچنین، در بخش تجربی بررسی خاصیت ضد میکروبی جهش طراحی شده بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ بخش نظری

ابتدا پروتئین Cap37 انسانی با کد 1a7s را از بانک RCSB بارگذاری شد و مختصات باقیمانده های ۱۲۰ تا ۱۴۶ (GTRCQVAGWGSQRS GGRLSRFPFVNV) در یک فایل جداگانه با پسوند PDB ذخیره شد. از آنجا که پپتیدها پیش از میانکنش با غشا باکتری باید در آب حل شوند و رسوب ندهند و بعد به داخل غشا باکتری نفوذ کنند، بخش نظری در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول برای بررسی امکان رسوب پپتید، پنج پپتید طبیعی به طور تصادفی در کنار حدود ۳۸ هزار مولکول آب با مدل spc216 قرار داده شدند و سپس ۴۰ یون سدیم و ۶۵ یون کلر برای ایجاد قدرت یونی ۱۴۰ میلی مولار و خنثی کردن بار کل سامانه با مولکول های آب جانشین شدند. شبیه سازی دینامیک مولکولی توسط برنامه ی گرومکس ۵ و با میدان نیروی G53A6 انجام شد. در ابتدا سامانه با الگوریتم کاهش پرشیب و شیب مزدوج کمینه سازی شد. سپس، در هنگرد NVT به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه و در هنگرد NPT به مدت ۱۰۰۰ پیکوثانیه دردمای ۱۰۰ کلوین سیستم به تعادل حجم و فشار و دما رسانده شد. در نهایت در هنگرد NPT به مدت ۵۰ نانوثانیه در فشار یک بار با بارموسسات پاریلنو-رحمان و دمای ۳۱۰ درجه کلوین با ترموستات نوز-هاور و ثابت جفت شدگی فشار و دمای

۰/۱ پیکوثانیه با گام زمانی دو فمتوثانیه شبیه سازی انجام شد [۷].

پپتیدهایی با خاصیت ضدباکتری باید دوگانه دوست باشند و از یک سو به خوبی در آب حل شوند و از سوی دیگر بتوانند به غشا هیدروفوب و پیچیده باکتری ها نفوذ کنند و از آن عبور کنند. بر اساس پیشنهاد مقالات برای افزایش خاصیت ضدباکتری پپتید Cap37 دو جهش طراحی شد. در جهش ۱ به جای ترادف SQRS که در ترادف طبیعی وجود داشت، ترادف WWRS قرار داده شد و در جهش ۲ به جای ترادف مذکور SWRW قرار داده شد. بنابراین، هر دو جهش به یک اندازه هیدروفوب تر از پپتید طبیعی بودند و تنها ترادف آن تفاوت داشت. به این ترتیب، نقش ترتیب اسیدهای آمینه در عبور از غشا بررسی می شود. سپس، هر کدام از جهش ها مشابه پپتید طبیعی به طور جداگانه شبیه سازی دینامیک مولکولی شدند و آنالیزهای مربوطه برای پپتیدهای طبیعی و جهش یافته انجام شد.

در مرحله دوم برای بررسی توانایی عبور پپتیدها از غشا، شبیه سازی هدایت شده (Smd) و در مرحله سوم شبیه سازی نمونه برداری چتری (US) انجام شد. غشا باکتری ها بسیار پیچیده است و ساخت یک مدل واقعی از غشا باکتری بسیار سخت و زمان بر است. نیمه خارجی غشا باکتری *Escherichia coli* از مولکول های لیپوساکارید LPS تشکیل می شود که بخش عمده آن شامل مولکول های لیپید A می شود. بنابراین، در این مطالعه غشا باکتری ها را به صورت ساده و صرفاً متشکل از مولکول های لیپید A به عنوان لیپوساکارید قسمت خارجی غشا باکتری ها در نظر گرفته شد [۸و۹].

مدل غشا دو لایه پیش به تعادل رسیده (pre-equilibrated) که متشکل از ۳۲ مونومر مولکول لیپید A و حدود ۴۵۰۰ مولکول آب و ۶۴ یون منیزیم بود و پارامترهای آن برای میدان نیروی G53A6 از آقای Thomas Piggot گرفته شد و به مدت ۱۰ نانوثانیه در هنگرد هم دما-هم فشار (NPT)

در دمای ۳۱۰ کلوین با گام زمانی دو فمتوثانیه شبیه سازی شد و ساختار نهایی غشا در حضور آب و یون‌ها به دست آمد. سپس، مولکول‌های آب و یون‌ها از جعبه شبیه سازی حذف شدند و یک مولکول پپتید طبیعی در راستای محور z در فاصله $4/2$ نانومتری مرکز جرم پپتید از مرکز جرم غشا قرار داده شد. ابعاد جعبه شبیه سازی در این مرحله در جهت محور x برابر با $5/3$ نانومتر و در جهت محور y برابر با $4/9$ نانومتر و در جهت محور z برابر با 13 نانومتر بود. همچنین، ۷۷۵۰ مولکول آب و ۶۴ یون منیزیم و ۵ یون کلر برای خنثی کردن بار سامانه مجدداً به جعبه شبیه سازی اضافه شد. در این مرحله سامانه ابتدا یک نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی در فشار یک بار و بارموسئات پارینلو-رحمان نیم همسانگرد (semi-isotropic) در صفحه $x-y$ و فیکس کردن ابعاد جعبه در جهت z شد و سپس به مدت دو نانوثانیه با گام زمانی یک فمتوثانیه شبیه سازی هدایت شده انجام شد. این شبیه سازی به سمت مرکز غشا با سرعت کشش ثابت (0.1 nm/ps) در جهت محور z و عمود بر سطح غشا انجام شد تا مسیر حرکت پپتید به داخل غشا (Reaction Coordinate) به دست آید. این سرعت کم است و باعث حرکت و ورود آرام پپتید به درون غشا بدون خراب شدن آن می شود. در این روش به پپتید نیروی ثابت وارد می شود تا در یک جهت خاص حرکت کند. سپس، در راستای محور z از مسیر حرکت شبیه سازی هدایت شده از فاصله $4/2$ نانومتری غشا ($z=0$) تا مرکز غشا هر ۲۰ پیکوثانیه یک ساختار مختصات (gro) با دستور `gmx trjconv` استخراج شد که در مجموع ۳۸ ساختار به دست آمد.

یکی از روش‌های محاسبه پتانسیل نیروی میانگین روش نمونه برداری چتری (umbrella sampling) است. پتانسیل نیروی میانگین انرژی آزاد به دست آمده از تابع توزیع شعاعی (تابع چگالی احتمال) در جهت مسیر واکنش (reaction coordinates) است و روش مناسبی برای نمونه

برداری از قسمت انتخاب شده‌ای از فضای صورت بندی یا مسیر واکنش است [۱۰].

بنابراین، در مرحله سوم هر کدام از ۳۸ ساختار به دست آمده از مرحله قبل، به عنوان یک پنجره چتری در شبیه سازی نمونه برداری چتری در نظر گرفته شد و هر ساختار در هر پنجره به مدت یک نانوثانیه شبیه سازی شد تا به تعادل برسد و یک نانوثانیه هم شبیه سازی نمونه برداری چتری با ثابت نیروی ریسستریت (مقید) ۱۰۰۰ کیلوژول بر نانومتر مربع برای مکان کلیه اتم‌های غشا و پپتید انجام شد. با محدود کردن مکان اتم‌ها نوسانات و درجات آزادی غیر ضروری حذف می شوند و شبیه سازی به یک سمت و جهت خاص هدایت می شود و سیستم مجبور به نمونه برداری از ساختارهای حد واسط (که در شبیه سازی و نمونه برداری معمولی قابل دسترس نیست) می شود. در این روش به تابع انرژی پتانسیل یک جمله اضافه می شود (پتانسیل هارمونیک)، به طوری که حالت‌های مطلوب که توسط سدهای انرژی از هم جدا می شوند، بتوانند به طور مناسبی نمونه برداری شوند [۱۱]. بنابراین، در مجموع در مرحله سوم ۷۶ نانوثانیه برای هر پپتید انجام شد.

در نهایت آنالیز بافت نگار (هیستوگرام) وزن دار شده (WHAM) (Weighted Histogram Analysis) با اجرای دستور `gmx wham` انجام شد. بافت نگار چتری در هر پنجره نشان دهنده توزیع احتمال مسیر واکنش جانب دارانه شده (بایاس) توسط پتانسیل چتری است. این بافت نگارها در پنجره‌ها باید همپوشانی داشته باشند و از انرژی آزاد در هر پنجره میانگین گرفته می شود [۱۲ و ۱۳]. در این دستور نتایج انرژی آزاد پنجره‌ها تجمیع و غیر جانب دارانه می شود تا انرژی آزاد در کل مسیر واکنش (نمودار PMF) به دست آید. $\Delta G_{w \rightarrow \text{tails}}$ برای عبور پپتید از غشا برابر با اختلاف قسمت تخت و قسمت کمینه انرژی (ابتدا و انتهای حرکت پپتید) در نمودار PMF است [۱۴ و ۱۵]. تمامی این مراحل برای پپتید جهش ۱ و ۲ به طور یکسان تکرار شد. به این

ترتیب ΔG عبور پپتید از غشا برای پپتیدهای طبیعی و جهش یافته‌ها به دست آمد. هر چه مقدار این سنجه کمتر باشد، به معنی عبور بهتر پپتید از غشا و افزایش خاصیت ضدباکتری آن است.

۲-۲ بخش تجربی

۲-۲-۱ باکتری‌ها

برای انجام تست‌های میکروبی از باکترهای / شرشیاکلائی (با کد بانک میکروبی PTCC1111)، / استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538)، باسیلوس سلباتیلیس (PTCC1254) و کلبسیلا پنومونیه (ATCC12028) استفاده شد.

۲-۲-۲ بررسی خاصیت ضد میکروبی پپتیدهای جهش یافته و طبیعی

برای بررسی تطابق بین داده‌های بیوانفورماتیکی و تجربی، توالی آمینواسیدی پپتید جهش یافته انتخابی (جهش ۲) و طبیعی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد تا سنتز شود. برای سنجش خاصیت ضد میکروبی این پپتیدها، آزمون میکروبی بررسی کمترین غلظت مهار کننده یا MIC از طریق میکروپلیت (ریز رقت سازی) بر روی باکتری‌های ذکر شده انجام شد.

۲-۲-۳ سنجش MIC به روش ریز رقت سازی برای بررسی خاصیت ضد میکروبی پپتید سنتز شده

برای بررسی خاصیت ضد میکروبی پپتید طبیعی و جهش یافته سنتز شده آزمون MIC به روش ریز رقت سازی انجام شد. برای همه‌ی میکروب‌ها کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه آزمون شامل موارد زیر بودند. کنترل منفی: آب مقطر، کنترل مثبت: آمپی‌سیلین برای باکتری‌های گرم مثبت و کانامایسین برای باکتری‌های گرم منفی و نمونه آزمون: پپتید Cap37 طبیعی و جهش یافته. غلظت استوک اولیه هر کدام از محلول‌های آزمون معادل ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. برای هر باکتری، استوک هر کدام از محلول‌های آزمون (به جز آب) در غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد

و سپس مراحل اجرای تست، مطابق با دستورالعمل ذکر شده انجام شد. در نهایت ۸ غلظت از محلول‌های مورد آزمون درون چاهک‌ها موجود بود که این غلظت‌ها به ترتیب کاهش عبارتند از ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵، ۴/۶۹، ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر در مورد نمونه کنترل منفی ۷۵ میکرولیتر آب مقطر با ۷۵ میکرولیتر محیط کشت میکروبی با غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند مخلوط شد [۱۶].

۳- نتایج

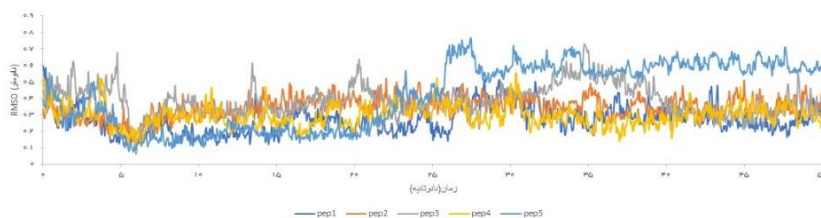
۳-۱ نتایج نظری

۳-۱-۱ شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتیدها در آب

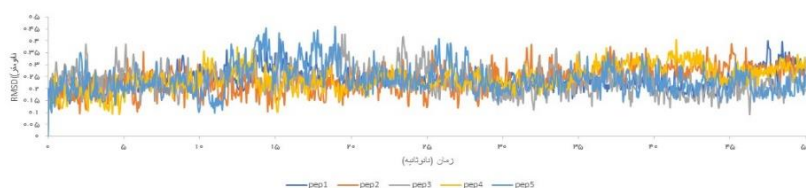
مشاهده ساختار نهایی شبیه سازی پنج پپتید طبیعی یا جهش یافته در آب بعد از ۵۰ نانوثانیه نشان داد که این پپتیدها در کنار هم جمع نشده‌اند، بنابراین، بررسی چشمی ساختارهای نهایی عدم رسوب این پپتیدها را تایید کرد. شکل ۱ مقادیر RMSD اسکلت اصلی هر پنج پپتید طبیعی و یا جهش ۱ و یا جهش ۲ در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی را نشان می‌دهد. این نمودارها تغییرات ناچیز انحراف استاندارد و در نتیجه رسیدن به تعادل ساختاری پپتیدها به‌ویژه در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی را بیان می‌کنند. بنابراین، تمامی آنالیزها در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی انجام شد.

محاسبه مقادیر انرژی پتانسیل سامانه‌ها در هر حالت بیانگر منفی بودن آن بود و تغییرات ناچیز آن در ۳۰ نانوثانیه آخر پایداری و به تعادل رسیدن سامانه‌ها از نظر انرژی پتانسیل را نشان می‌داد. همچنین، میانگین و انحراف معیار دما در ۳۰ نانوثانیه آخر در هر حالت بیانگر رسیدن به تعادل گرمایی در دمای ۳۱۰ کلوین بود. از آنجا که در هر جعبه شبیه سازی ۵ پپتید طبیعی یا جهش یافته داشتیم، خواص هر کدام از پپتیدها در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی محاسبه شد و برای ۵ پپتید میانگین گرفته شد.

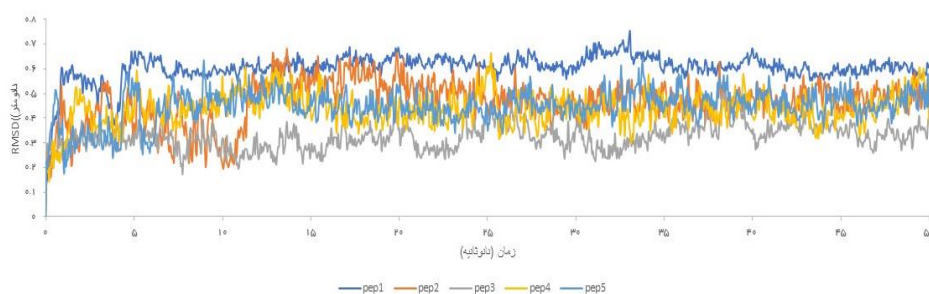
الف



ب



ج



شکل ۱ مقادیر RMSD اسکلت اصلی پنج پپتید در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی. الف. طبیعی، ب. جهش ۱، ج. جهش ۲.

جدول ۱ میانگین نتایج به دست آمده در ۳۰ نانو ثانیه آخر نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی پنج پپتید طبیعی و با جهش یافته

RMSD (نانومتر)	RMSF (نانومتر)	شعاع چرخش (نانومتر)	فاصله مراکز جرم (نانومتر)	تعداد پیوند هیدروژنی بین پپتید با خودش	تعداد پیوند هیدروژنی بین پپتید و آب	سطح در دسترس حلال (نانومتر مربع)	
0.39 ± 0.12	0.23 ± 0.04	1.1 ± 0.03	4.4 ± 1.16	11.8 ± 1.32	65.02 ± 1.82	28.57 ± 0.46	پپتید طبیعی SQRS
0.24 ± 0.03	0.14 ± 0.01	1.1 ± 0.03	5.1 ± 1.53	11 ± 0.9	61.8 ± 2.6	28.8 ± 0.11	جهش ۱ WWRS
0.47 ± 0.1	0.16 ± 0.02	1.1 ± 0.1	5.23 ± 1.76	11.22 ± 0.7	60.02 ± 4.8	29.1 ± 0.6	جهش ۲ SWRW

جدول ۱ نتایج میانگین جذر میانگین مربعات جابه جایی ها (RMSD) اسکلت اصلی همه پنج پپتید و همین طور برای شعاع چرخش (Rg) آنها و تعداد پیوند هیدروژنی بین

پپتیدها و آب و تعداد پیوند هیدروژنی هر پپتید با خودش در هر جبهه شبیه سازی و میانگین سطح در دسترس پپتیدها و مقادیر میانگین RMSF پپتیدها و میانگین فاصله بین

مرکز جرم تمام جفت پپتیدها (۱۰ جفت) برای پپتیدهای طبیعی و جهش یافته را نشان می‌دهد.

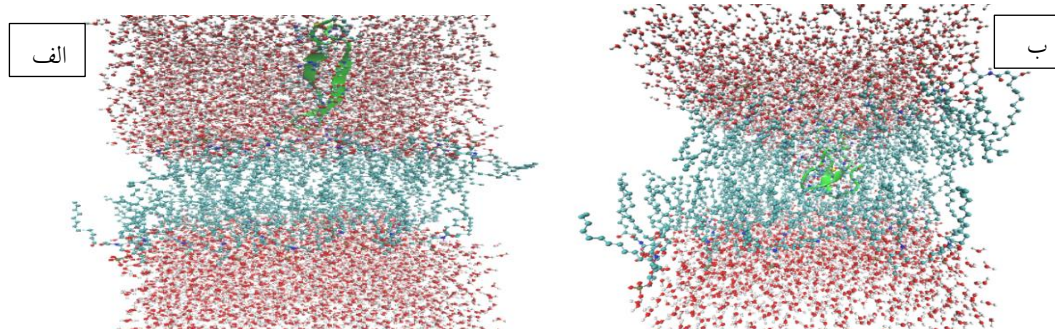
مقادیر RMSF پپتیدهای جهش یافته نسبت به پپتید طبیعی کمتر شده است که بیانگر انعطاف ناپذیرتر شدن آن در اثر این جهش‌ها است. زیرا زنجیره جانبی بزرگ اسید آمینه تریپتوفان مانع تحرک بقیه باقیمانده‌های پپتید می‌شود. نتایج شعاع چرخش برای پپتید طبیعی و جهش یافته‌ها اختلاف قابل توجهی را نشان نداد که بیانگر عدم تاثیر جهش‌ها در ساختار سوم و کلی پپتیدها در اثر جهش است. نتایج حاصل از فاصله مرکز جرم پپتیدها از یکدیگر نشان می‌دهد در اثر جهش پپتیدها فاصله بیشتری از هم گرفته‌اند که می‌توان نتیجه گرفت که امکان رسوب کردن پپتیدهای جهش یافته کم می‌شود. به عبارت دیگر، انعطاف ناپذیر شدن پپتیدها مانع نزدیک شدن آنها به یکدیگر شده است که با بررسی‌های چشمی ساختار نهایی شبیه‌سازی‌ها هماهنگ است. میانگین تعداد پیوند هیدروژنی پپتیدها با خودشان و با آب در اثر جهش کاهش کمی داشت که به علت قرار گرفتن باقیمانده تریپتوفان به جای باقیمانده سرین و عدم توانایی تریپتوفان برای تشکیل پیوند هیدروژنی منطقی به نظر می‌رسد. کاهش جزیی تعداد پیوند هیدروژنی پپتید با آب می‌تواند منجر به کاهش حلالیت جهش یافته‌ها شود. البته با توجه با افزایش فاصله مرکز

جرم پپتیدها از هم و عدم تغییر سطح در دسترس حلال پپتیدها می‌توان نتیجه گرفت کاهش تعداد پیوند هیدروژنی پپتیدها با آب اثر چندانی در حلالیت نداشته است. به طور کلی شباهت نتایج پپتید ۱ و ۲ به علت شباهت ساختاری آنها است و جابه‌جایی تریپتوفان در جهش ۱ و ۲ اثر قابل توجهی در خواص ترمودینامیکی آن جهش نداشته است. در مجموع نتایج شبیه‌سازی پپتیدها در آب با توجه به کوچک بودن پپتیدها و نوسان ساختاری آنها نتایج قابل قبول داشت و رسیدن به پایداری و همگرا شدن سامانه‌ها را نشان داد. ساختار نهایی پپتید اول از پنج پپتید موجود در جعبه شبیه‌سازی در هر کدام از حالت‌های طبیعی و جهش یافته برای مرحله بعد استفاده شد.

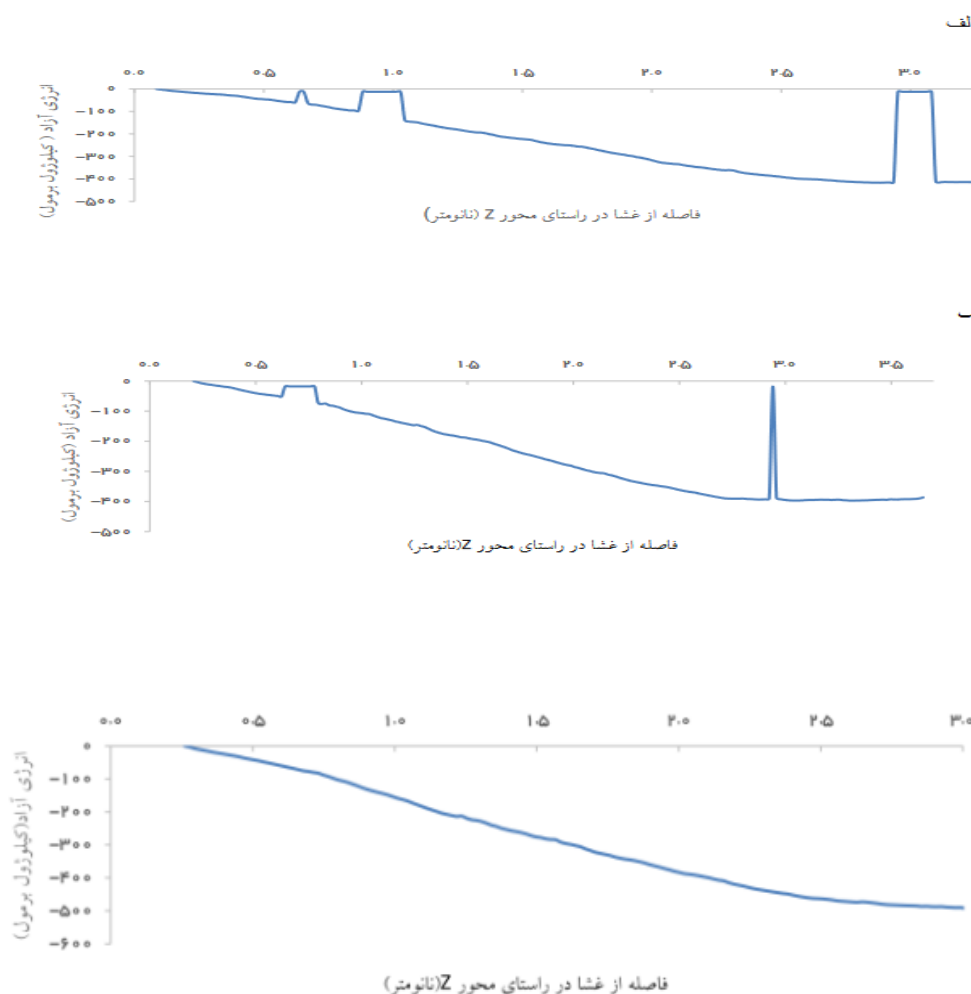
۳-۱-۲ نتایج شبیه سازی هدایت شده و نمونه برداری

چتری پپتیدها

پس از انجام شبیه‌سازی هدایت شده، شبیه‌سازی نمونه برداری چتری انجام شد. ساختار شروع و پایان نمونه برداری چتری پپتید طبیعی در شکل ۲ نشان داده شده است. نمودار انرژی آزاد برای پپتید طبیعی و جهش ۱ و ۲ در فواصل مختلف پپتید از غشا در راستای محور Z به کمک شبیه سازی نمونه برداری چتری به دست آمد و در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲ ساختار شروع (الف) و پایان (ب) پپتید طبیعی در روش نمونه برداری چتری (اتم‌های آب و لیپید A با روش CPK و اتم‌های پپتید با روش NewCaton سبز رنگ نشان داده شده‌اند).



شکل ۳ نمودار انرژی آزاد برای پپتید طبیعی (الف) و جهش ۱ (ب) و ۲ (ج) در فواصل مختلف پپتید از غشا

چه میزان این انرژی کمتر و منفی تر باشد، پپتید عبور بهتری از غشا دارد. پپتید با جهش ۲ (SWRW) دارای کمترین انرژی عبور از غشا است. بنابراین، حدس زده می شود قدرت نفوذ و خاصیت میکروپ کشی آن بیشتر شده است. به عبارت دیگر، جهش ۱ نسبت به پپتید طبیعی شرایط بدتر و جهش ۲ نسبت به پپتید طبیعی شرایط بهتری برای عبور از غشا را دارد. بنابراین، می توان نتیجه گرفت جهش ۲ (SWRW) بهتر از پپتید طبیعی (SQRS) و جهش ۱ (WWRS) می تواند وارد غشا باکتری شود و آن را تخریب کند. همچنین، می توان نتیجه گرفت علیرغم این که هر دو جهش ۱ و ۲ به اندازه ۷/۴ درصد نسبت به

کاهش یکنواخت و تدریجی انرژی آزاد پپتیدها در هنگام ورود به غشا در نمودارهای PMF منطقی به نظر می رسد، زیرا از یک سو بار مثبت پپتید باعث جذب آنها به سرمنفی لیپید A می شود و از سوی دیگر خاصیت هیدروفوبیستی پپتیدها (۳۳/۳ درصد برای پپتید طبیعی و ۴۰/۷ درصد برای جهش یافته ها) انگیزه زیادی برای ورود پپتیدها به داخل غشا ایجاد می کند. محاسبه مقادیر اختلاف انرژی آزاد بین حالت تخت و حالت کمپنه انرژی آزاد در این نمودارها در شبیه سازی نمونه برداری چتری برای پپتیدهای طبیعی و جهش ۱ و جهش ۲ به ترتیب مقادیر ۴۱۳/۱- و ۳۸۶/۲۷- و ۴۸۸/۸۵- کیلوژول بر مول را نشان می دهد. هر

پتید طبیعی هیدروفوب تر شده‌اند، تنها به علت تفاوت در محل تریپتوفان و سرین و آرژنین (SWRW یا WWRS) عکس‌العمل متفاوتی در عبور از غشا داشته‌اند. همچنین، می‌توان نتیجه گرفت که قرار گرفتن دو اسید آمینه تریپتوفان در کنار هم در جهش ۱، منجر به کاهش توانایی عبور پتید از غشا و قرار گرفتن یک در میان تریپتوفان‌ها با اسید آمینه‌های سرین و آرژنتین منجر به افزایش توانایی عبور از غشا نسبت به پتید طبیعی شده است. بنابراین، ترتیب اسیدهای آمینه هم در کنار بار و هیدروفوبیسیتهی آنها در هنگام طراحی پتید ضدباکتری بایستی در نظر گرفته شود.

۲-۳ نتایج تجربی

۱-۲-۳ تهیه و سنجش MIC

در ابتدا ۵ میلی‌گرم از هر کدام پتیدهای طبیعی و جهش ۲ با خلوص ۹۰٪ > توسط ستون کروماتوگرافی تخلیص و تهیه شد. نتایج حاصل از سنجش MIC در جدول ۲ ذکر شده است. کنترل منفی آب و کنترل مثبت آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن و آمپی‌سیلین با MIC کمتر از ۴/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

۴-بحث

گلول‌های سفید دارای تعدادی از پتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی هستند که به آنها در حمله‌ی تخریبی به باکتری‌ها کمک می‌کند. این مولکول‌های پادزیست داخلی به دلیل تنوع در ساختار و سرعت عمل و نحوه‌ی تعامل

آنها با موجود زنده هدف مورد توجه قرار گرفته‌اند. پتیدهای ضد میکروبی طیف وسیعی از موجودات زنده هدف از ویروس‌ها تا انگل‌ها را در بر می‌گیرند [۱].

پتیدهای ضد میکروبی می‌توانند با جایگزینی آمینواسیدهای مناسب بهینه شوند، که این امر رابطه بین ساختار و عملکرد را مشخص کرده و به کنترل سمیت و فعالیت آنها کمک می‌کند [۱۷]. همچنین، بررسی خصوصیات ضد میکروبی در بیوانفورماتیک به کشف سازوکار عملکرد و توسعه روش‌های کاربردی در زیست‌فناوری می‌انجامد. تاکنون گزارشی مبنی بر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پتید Cap37 نشده است.

در بخش نظری، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پتید Cap37 در آب و دو حالت جهش یافته آن و همچنین با روش نمونه‌برداری چتری برای محاسبه پتانسیل نیروی میانگین ورود این پتیدها به غشا لیپید A که مدلی از غشا باکتری‌های گرم منفی است، انجام شد. پتید با جهش ۲ یا SWRW به دلیل منفی‌تر بودن انرژی آزاد عبور پتید از غشا نسبت به پتید طبیعی و پتید جهش ۱ برای انجام آزمون‌های تجربی انتخاب شد. گوردون و همکاران نشان دادند که CAP37 و مشتقات پتیدی آن فعالیت ضد باکتری را در برابر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و باکتری‌های گرم مثبت خاص مانند استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس انتروکوکوس نشان می‌دهند.

جدول ۲ نتایج مربوط به سنجش MIC به روش ریز رقت‌سازی پتید طبیعی و پتید جهش یافته

MIC (µg/ml)				
کلبسیلا پنومونیه	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس ساتیلیس	اشریشیا کلائی	باکتری پتید
۱۸/۷۵	۷۵	۷۵	۳۷/۵	پتید طبیعی
۱۸/۷۵	۱۸/۷۵	۱۸/۷۵	۳۷/۵	پتید جهش یافته

در کنار پادزیست‌های سنتی برای افزایش کارایی آنها بهره‌برداری شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

۶-منابع

- [1] Biswas, S *et al.*, (2023). Understanding the Role of Antimicrobial Peptides in Neutrophil Extracellular Traps Promoting Autoimmune Disorders. *Life*. 13, 6
- [2] Kasus-Jacobi, A., Noor-Mohammadi, S., Griffith, G.L., Hinsley, H., Mathias, L and Pereira, H.A. (2015) A multifunctional peptide based on the neutrophil immune defense molecule, CAP37, has antibacterial and wound-healing properties. *J Leukoc Biol*. 97,341-50.
- [3] Pereira, H.A (1995) CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator. *J Leukoc Biol*. 57,805-12.
- [4] Stock, A.J., Kasus-Jacobi, A., Wren, J.D., Sjoelund, V.H., Prestwich, G.D., Pereira, H.A. (2016) The Role of Neutrophil Proteins on the Amyloid Beta-RAGE Axis. *PLoS One* 11,1-29.
- [5] Stock, A.J., Kasus-Jacobi, A., Pereira, H.A. (2018) The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 15,240.
- [6] Schulze, J.C. (2017) *Molecular Dynamics Simulations in GROMACS*. Project report. Norwegian University of science and technology.
- [7] Mahnam, K., Foruzandeh, S., Mirakhorli, N., Saffar, B. (2018) Experimental and theoretical studies of cadmium ions absorption by a new reduced recombinant defensin. *J Biomol Struct Dyn*. 6,2004-2014.
- [8] Kim, S., Patel, D.S., Park, S., Slusky, J., Klauda, J.B., Widmalm, G and Im, W. (2016). Bilayer Properties of Lipid A from Various Gram-Negative Bacteria. *Biophys J*. 111, 1750–1760.
- [9] Piggot, T.J., Holdbrook, D.A and Khalid S. (2011) Electroporation of the *E. coli* and *S. aureus* Membranes: Molecular Dynamics Simulations of Complex Bacterial Membranes. *J. Phys. Chem*. 115, 13381–13388.

بنابراین، پپتید طبیعی بر روی هر دو گروه باکتری‌ها اثر مناسبی دارد [۱۸].

پریرا و همکاران با مطالعه بر روی پپتید سنتزی، توالی اسید آمینه NQGRHFCGGALIHARFVMTAASCFQ، بر اساس باقیمانده‌های ۲۰-۴۴ پروتئین CAP37، نشان داد که این پپتید نقشی مشابه آنتی‌بیوتیک دارد و در غلظت‌های آزمایش شده، دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *شریشیا کلی*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است [۲].

آزمون MIC نشان داد که پپتید جهش یافته علیه باکتری‌های گرم مثبت به خوبی عمل کرده و منجر به مهار رشد آنها می‌شود. یمان و همکاران طی مطالعه‌ای بر روی سازوکار عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی، بیان کردند که اسید تیکوئیک یافت شده در باکتری‌های گرم مثبت کمتر دچار تغییراتی مانند اضافه شدن قند و پپتید می‌شود و در برابر اثر ضد میکروبی این پپتیدها حساس‌تر هستند. بنابراین، اثر آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است [۱۹]. با توجه به بیان مطلب ذکر شده شاید بتوان اثر گذاری کمتر پپتید جهش یافته بر روی باکتری‌های گرم منفی را توجیه کرد.

۵-نتیجه‌گیری

در این پژوهش، طراحی جهش و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی عبور پپتید CAP37 از غشای لیپید A انجام شد. از میان جهش‌های انجام شده، جهش SWRW با توجه به افزایش توانایی عبور از غشا نسبت به پپتید طبیعی انتخاب شد. نتایج آزمون‌های میکروبی پپتید سنتز شده نشان‌دهنده ارزش این پپتید در تأثیرگذاری بر باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* بود. با توجه به نتایج این پژوهش، امید است که از این پپتید در صنایع دارویی و پزشکی به‌عنوان یک پادزیست جدید یا

- Solute Partitioning into Lipid Membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5351–5361.
- [15] Meng, F & Xu, W. (2013). Drug permeability prediction using PMF method. *J Mol Model* 19,991–997.
- [16] Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J antimicrob Chemother.* 48,5-16.
- [17] Pasupuleti, M., Schmidtchen, A& Malmsten, M. (2012).Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol.* 32,143-71.
- [18] Gordon, Y.G., Romanowski, E.G., Shanks, R.M.Q., Yates, K.A., Hinsley, H., and Pereira, H.A. (2009). CAP37-derived antimicrobial peptides have in vitro antiviral activity against adenovirus and herpes simplex virus type 1. *Curr Eye Res.* 34,241-249.
- [19] Yeaman, M.R & Yount, Y.N. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol rev:* 55, 27-55.
- [10] Carpenter, T.S., Kirshner, D.A., Lau, E.Y., Wong, S.E., Nilmeier, J.P and Lightstone, F.C. (2014). A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J* .107, 630–641.
- [11] Menichetti, R., Kremer, K., Bereau, T (2018). Efficient potential of mean force calculation from multiscale simulations: Solute insertion in a lipid membrane, *Biochem & Biophys Res Commun.* 498,282-287.
- [12] Hub, J.S., Groot, B.Ld and Spoel, D.Vd. (2010). g_whams-A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 3713–3720.
- [13] Roux B (1995). The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Comput Phys Commun.* 91,275-282.
- [14] Christian, L. W., Spoel, D.Vd and Hub, J.S. (2012). Large Influence of Cholesterol on

Theoretical Design via Umbrella Sampling and Experimental Investigation of a New Mutation in Cap37 to Increase its Antibacterial Property

Mehri Hedayati¹, Karim Mahnam^{2, 4}, Behnaz Saffar^{*3, 4}

1. MSc degree of microbial biotechnology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord- Iran

2. Associated professor, Department of Biology, Faculty of science, Shahrekord University, Shahrekord- Iran

3. Associated professor, Department of Genetics, Faculty of science, Shahrekord University, Shahrekord- Iran

4. Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

saffar_b@ @sku.ac.ir

Receipt: 2023/09/17

Accepted: 2025/01/26

Abstract

The increase in antibacterial resistance due to the high consumption of antibiotics is a looming crisis for humanity. Natural antibacterial compounds, such as cationic antibacterial peptides, hold a significant position, as the likelihood of developing resistance against them is low. CAP37, or AZU1, is a protein derived from the granules of human neutrophils and functions as a natural antibiotic. The residues 20-44 of CAP37 exhibit antibacterial activity. In this study, two mutations were designed in the native CAP37 peptide to enhance its antibacterial activity. Molecular dynamics simulations of the peptides in water were conducted for 50 ns, along with umbrella sampling MD simulations to obtain reliable potential of mean force (PMF) profiles for each peptide's passage through lipid A, a component of the bilayer membrane. The results indicated that the peptide containing the SWRW sequence exhibited lower aggregation properties in water and a greater tendency to traverse the lipid A bilayer membrane compared to the native (SQRS) or WWRS sequences. Therefore, it can be concluded that CAP37 with the SWRW sequence has enhanced antimicrobial activity. To validate the theoretical findings, both the natural and SWRW mutant peptides were synthesized. The minimum inhibitory concentration (MIC) test conducted on various Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*, demonstrated that the mutated peptide exhibited antibacterial activity, thereby confirming the theoretical results.

Keywords: Antimicrobial peptide, Cap37 protein, Molecular dynamic simulation, MIC test, mutated peptide.