زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

اثر پپتید اسیدی و آمیدی مشتق از پروتئین استئو کلسین بر تشکیل نانوبلورهای‌های هیدروکسی آپاتیت

سمانه حسینی[1]، حسین نادری‌منش[1*]، شهاب فقیهی[2*]

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 175-14115، 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 پپتیدی مشتق از استئوکلسین در نتیجه تغییر یک گروه عاملی و تأثیر آن بر تشکیل نانوبلور هیدروکسی آپاتیت است. قطعه پپتیدی شامل 13 اسید آمینه از پروتئین استئوکلسین، 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 پپتیدهای ساخته شده استفاده شد. همچنین اثر سمیت پپتیدهای ساخته شده بر سلول‌های استئوبلاستی ارزیابی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی بیانگر تشکیل نانوبلور هیدروکسی آپاتیت در حضور پپتید آمیدی است؛ در حالی که ذرات فسفات کلسیم بی‌شکل در حضور پپتید اسیدی تشکیل شده است. بررسی ساختار دوم با استفاده از طیف دورنگ‌نمایی دورانی، ساختار راندتصادفی فنر با بیضی واری مولی کمتر برای پپتید آمیدی را تأیید کرد. بررسی اثر سمیت نشان داد که پپتید آمیدی، رشد سلول‌های استئوبلاستی را به‌گونه‌ای چشم‌گیر افزایش می‌دهد. نتایج میکروسکوپ الکترونی و میزان رشد سلول‌های استئوبلاستی، تأیید کننده افزایش فعالیت زیستی توالی پپتیدی در اثر تغییر گروه کربوکسیل به گروه آمیدی است. استفاده از پپتیدهایی 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

تقلید زیستی[1]، از زمینه‌های مهم نانوزیست‌فناوری است که برای طراحی مواد و سامانه‌های کاربردی، از ساختارهای زیستی و کارکرد آن‌ها در طبیعت الهام گرفته و در ساخت سامانه‌های زیستی از اجزای سنتزی استفاده می‌کند [1]. مواد غیرآلی که به‌وسیله ارگانیسم‌های زیستی ساخته می‌شود، بیشتر ویژگی‌های ساختاری و

1. Biomimetic

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

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 معدنی شدن زیستی[1]، استفاده از روش‌های پایین به بالا[2] است؛ در این روش‌ها، ساخت مواد از مقیاس‌های اتمی و مولکولی آغاز می‌شود و سبب تشکیل اجزای ساختمانی نانوساختار شده و در نهایت به ساختارهای پیچیده سازمان‌دهی می‌شود [2]. اساس معدنی شدن 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 استخوان[3] نمونه‌ای از معدنی شدن زیستی است؛ در این فرایند، ماتریکس خارج سلولی شامل پروتئین‌هایی مانند استئوپونتین، سیالوپروتئین و کلاژن نوع I با هیدروکسی‌آپاتیت برهم‌کنش داده و در هسته‌زایی، رشد و مورفولوژی بلور هیدروکسی‌آپاتیت نقش ایفا می‌کند [5، 6]. مطالعات معدنی شدن در آزمایشگاه، اطلاعات ارزشمندی درباره‌ی کارکرد پروتئین‌های اسیدی غیرکلاژنی[4] فراهم کرده است [7]. برای نمونه، نتایج این پژوهش‌ها، اثر مهاری پروتئین استئوپونتین و اثر افزایشی پروتئین‌های DMP1[5] و BSP[6] را بر تشکیل ماده معدنی استخوان تأیید می‌کند [8 ، 9]. بررسی‌هایی که روی بافت استخوان و تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت انجام شده، نشان 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 معدنی شدن و تشکیل بافت استخوانی دارد [13، 14]. بررسی‌های کریستالوگرافی با اشعه ایکس نشان داده است که استئوکلسین پروتئینی کروی با سه مارپیچ آلفا است که مارپیچ نخست، با مواد معدنی بافت استخوان برهم‌کنش دارد [15]. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که پروتئازهای 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 معدنی شدن 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

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

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

در این بررسی، از قطعه پپتیدی 13 اسید آمینه‌ای که بخشی از توالی پروتئین استئوکلسین است برای تقلید زیستی، الگوبرداری شده است. این توالی می‌تواند به یون کلسیم وصل شود و بنابراین انتظار می‌رود باعث تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت 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 الگوبرداری‌شده، با تغییر انتهای کربوکسیل توالی پپتیدی مورد نظر به گروه آمیدی تعیین شد. دورنگ‌نمایی دورانی[1] و میکروسکوپ الکترونی به ترتیب برای بررسی ساختار و بررسی تشکیل و یا عدم تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در حضور دو پپتید، استفاده شد. همچنین، اثر پپتیدهای ساخته شده بر سلول‌های استئوبلاستی برای بررسی سمیت آن‌ها ارزیابی شد. این بررسی برای ایجاد درک بهتر از ساز و کار تشکیل ساختار سخت استخوان و به دنبال آن، پیشرفت روش‌های تقلید زیستی برای ترمیم بافت سخت، طراحی و انجام شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- سنتز پپتید

توالی 13 اسید آمینه‌ای الگوبرداری شده از استئوکلسین به روش فاز جامد به‌صورت اسیدی و آمیدی سنتز شد. توالی اسیدهای آمینه پپتید ساخته شده به‌صورت LEPRREVCELNPD است. رزین رینک آمید[2] برای ساخت پپتید آمیدی و وانگ رزین[3] برای سنتز پپتید اسیدی انتخاب شد. اسیدهای آمینه از انتهای آمینی به‌وسیله گروه Fmoc[4] محافظت می‌شوند. نخستین اسید آمینه از انتهای کربوکسیلیک خود به رزین پیوند داده شده و سپس گروه Fmoc به‌وسیله 20 درصد پیپریدین[5] در دی متیل فرمامید[6] جدا شده و اسید آمینه محافظت شده بعدی اضافه می‌شود. اتصال اسیدهای آمینه در حضور TBTU و N- اتیل ایزوپروپیل آمین[7] انجام می‌شود. پپتید ساخته شده به‌وسیله‌ی مخلوط تری‌فلورواستیک اسید، آب و TIS[8] (95: 2/5: 2/5) از رزین جدا و در دی‌اتیل اتر سرد، رسوب داده شد. پپتیدها به‌صورت دستی در ستون شیشه‌ای 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 تری‌فلورو استیک‌اسید) با سرعت جریان 3 میلی‌لیتر در دقیقه شست‌وشو 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 آن‌ها به‌وسیله طیف‌سنجی جرمی تأیید شد.

2-3- مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

در این پژوهش طیف‌های CD به‌وسیله‌ی اسپکتروپلاریمتر جاسکو-810 (Jasco-810) ثبت شد. در این آزمایش‌ها

1. Circular Dichroism
2. Rink amide MBHA resin
3. Wang resin
4. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
5. Piperidine
6. Dimethylformamide
7. N-ethyl isopropylamin
8. Triisopropylsilane

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

پارامتر بیضی واری مولی[1] در دامنه طول موجی مورد نظر اندازه‌گیری شد. بیضی‌واری مولی از رابطه زیر به‌دست 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 ($dmol^{-1}$ (deg cm^2 $dmol^{-1}$) $[\theta]_{290/5}$=7.910 با 10- (+) کامفورسولفونیک اسید انجام شد.

2-4- اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه ذرات

میانگین اندازه پپتیدها با روش پراکندگی دینامیکی نور[2] (DLS) به‌وسیله دستگاه نانوزتا سایزر (مالورن- انگلیس) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. این دستگاه به نور لیزر هلیوم - نئون مجهز است. همچنین، پتانسیل زتای پپتیدها به‌وسیله 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 عبوری[3] (TEM) بررسی شد. بدین‌گونه که تشکیل نانوبلورهای آپاتیت روی گریدهای TEM، انجام شد. 10 میکرولیتر شامل محلول‌های کلرید کلسیم و دی‌سدیم هیدروژن‌فسفات به‌ترتیب با غلظت‌های نهایی 3/3 میلی‌مولار و 1/6 میلی مولار 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 (اینویتروژن-آمریکا) و (5 درصد) 100 میکرو گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (اینویتروژن-آمریکا) و 10 درصد FBS در انکوباتور با CO_2 کشت داده شد. سپس تعداد 10^4 سلول درون چاهک‌های بشقاب 96 خانه قرار داده شد. در زمان‌های 2، 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

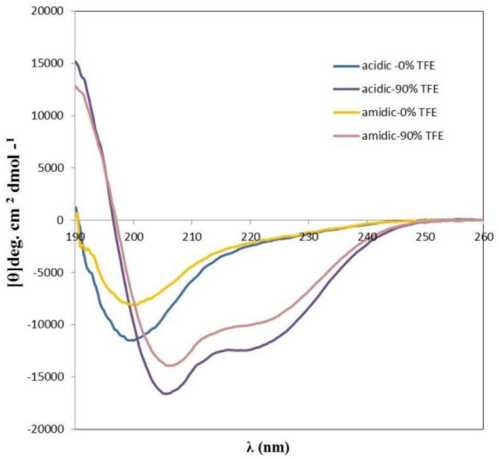
توالی پپتیدی الگوبرداری شده از پروتئین استئوکلسین، به دو شکل آمیدی و اسیدی به‌ترتیب با وزن مولکولی 1568/8 و 1569/7 به روش فاز جامد ساخته شد.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

3-2- مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی

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



شکل 1 طیف دورنگ‌نمایی دورانی از پپتیدهای اسیدی و آمیدی مشتق‌شده از پروتئین استئوکلسین در آب و تری‌فلوراتانول 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 پپتید اسیدی و 6/59- میلی‌ولت برای پپتید آمیدی است (جدول 1). همچنین، میانگین اندازه ذرات برای پپتید اسیدی و آمیدی به ترتیب 444/7 و 450 نانومتر است که گویای تجمع پپتیدها در محلول است (جدول 1).

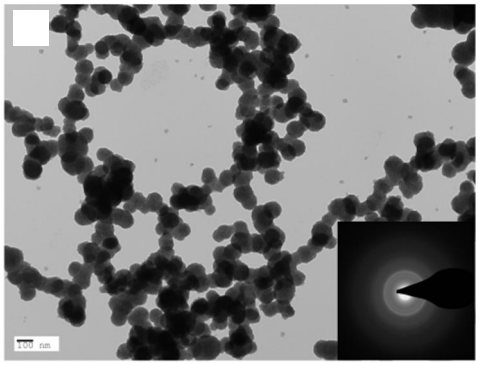
جدول 1 میانگین پتانسیل زتا و اندازه ذرات برای پپتید اسیدی و آمیدی

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

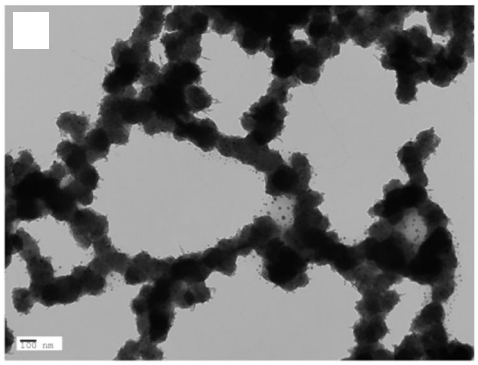
3-4- بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی (TEM)

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

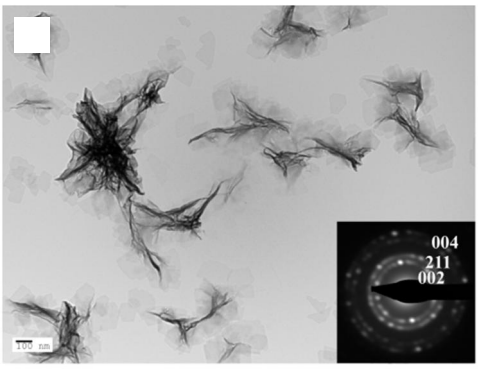
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



(الف)



(ب)

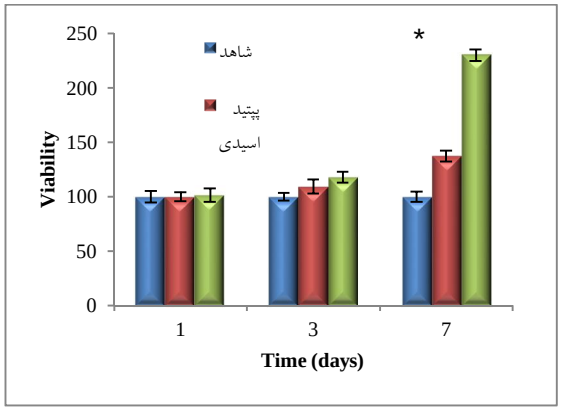


(ج)

شکل 2 تصاویر میکروسکوپ الکترونی از تشکیل فسفات کلسیم در نمونه الف) شاهد، ب) پپتید اسیدی ج) پپتید آمیدی بعد از2 ساعت. فسفات کلسیم بی‌شکل در نمونه‌های شاهد و پپتید اسیدی و بلورهای آپاتیت در نمونه پپتید آمیدی دیده می‌شود.

3-5- تست سمیت

به خاطر کاربرد پپتیدهای 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 پپتیدها نه تنها برای سلول‌های استئوبلاستی سمی نیست، بلکه میزان رشد آن‌ها را تا دو برابر افزایش داده است. همچنین، رشد سلول‌ها در حضور پپتید آمیدی نسبت به پپتید اسیدی به میزان چشم‌گیری بیشتر است ($p<0/05$).



شکل 3 بررسی اثر سمیت پپتیدهای اسیدی و آمیدی مشتق‌شده از پروتئین استئوکلسین بر سلول‌های استئوبلاست

4- بحث و نتیجه‌گیری

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 پپتیدهایی که می‌توانند معدنی شدن را افزایش دهند می‌تواند برای افزایش تشکیل بافت معدنی استخوان پیرامون کاشتنی‌ها و همچنین

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

قسمت‌هایی که نیاز به تشکیل بافت سخت دارند، مفید باشد. از سوی دیگر، طراحی و ساخت پپتیدها 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 پپتیدی 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 پپتید آمیدی نشان می‌دهد. اگرچه تشکیل فسفات کلسیم بی‌شکل در حضور هر دو پپتید دیده می‌شود، اما نانوبلور هیدروکسی‌آپاتیت تنها در حضور پپتید آمیدی تشکیل شده است. بنابراین، پپتید در تشکیل فسفات کلسیم بی‌شکل نقشی ندارد و پپتید آمیدی سرعت تبدیل فسفات کلسیم بی‌شکل به بلور آپاتیت را افزایش می‌دهد. این تفاوت کارکرد را می‌توان نتیجه‌ی مدیفیکاسیون در توالی و ساختار پپتید الگوبرداری شده، دانست.

همان‌گونه که نتایج دورنگ‌نمایی دورانی نشان می‌دهد، ساختار تصادفی کویل در هر دو پپتید دیده می‌شود، اما میزان بیضی‌واری برای پپتید آمیدی کمتر است که اثر تغییر گروه کربوکسیل انتهایی به گروه آمیدی را نشان می‌دهد. همچنین، در حلال آلی تری‌فلورواتانول، در هر دو پپتید، انتقال ساختاری از کویل تصادفی به مارپیچ آلفا رخ داده است که نشان می‌دهد پپتیدهای سنتز شده از دیدگاه ساختاری انعطاف‌پذیر است و توانایی تغییر ساختار در شرایط مختلف را دارد. این ویژگی در پروتئین‌ها و پپتیدهایی که در معدنی شدن زیستی نقش دارند، دیده شده است [23، 24]. مدیفیکاسیون گروه کربوکسیل به گروه آمیدی در تغییر بار سطحی دو پپتید نیز تفاوت چشم‌گیری ایجاد کرده است؛ به‌گونه‌ای که هر دو پپتید 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 پپتید آمیدی کاهش داده است؛ به‌عبارتی پپتید آمیدی نسبت به پپتید اسیدی مثبت‌تر شده است. بنابراین انتظار می‌رود برهم‌کنش دو پپتید با یون‌های تشکیل‌دهنده هیدروکسی‌آپاتیت برای تشکیل بلور، متفاوت باشد.

بر اساس نتایج بررسی‌های دورنگ‌نمایی دورانی می‌توان گفت که مدیفیکاسیون در توالی پپتیدی مورد نظر موجب تغییر ساختار شده که افزایش کارکرد پپتید را به‌دنبال دارد. این نتیجه با مطالعات میکروسکوپ الکترونی تأیید شد. همان‌گونه که دیده می‌شود، تغییر گروه کربوکسیل به گروه آمیدی، فعالیت زیستی پپتید را افزایش داده است. این نکته قابل توجه است که پپتیدهای حاوی گروه آمیدی نسبت به پپتیدهای با انتهای اسیدی، فعالیت زیستی بیشتری دارد [25]. با توجه به میزان بار سطحی پپتیدها می‌توان پیشنهاد کرد که برهم‌کنش مؤثرتر یون‌های کلسیم و فسفات و پپتید آمیدی می‌تواند دلیل کارکرد متفاوت این پپتید در تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت باشد. از دیدگاه ترمودینامیکی، اتصال اختصاصی پپتید 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 پپتید آمیدی را نشان می‌دهد. اگرچه هر دو پپتید اسیدی و آمیدی، نبود سمیت و افزایش رشد سلول‌های استئوبلاستی را سبب می‌شوند، اما افزایش فعالیت زیستی پپتید آمیدی نسبت به پپتید اسیدی کاملاً نمایان است. این

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

افزایش فعالیت، مربوط به گروه آمیدی در توالی سنتز شده است. به‌نظر می‌رسد افزایش بار سطحی مثبت که به‌خاطر مدیفیکاسیون در توالی پپتیدی ایجاد می‌شود، نفوذپذیری سلول‌ها را برای ورود بیشتر فاکتورهای مؤثر در رشد، افزایش داده است. بررسی‌های پیشین گویای آن است که پپتیدهای کاتیونی، نفوذپذیری سلول‌ها را افزایش می‌دهند [27، 28]. برهم‌کنش بارهای مثبت پپتیدهای کاتیونی با بار منفی فسفولیپیدهای غشای سلولی، باعث به‌هم‌خوردن نظم طبیعی دو لایه فسفولیپیدی غشای شده و با تشکیل میسل‌های وارونه، موجب افزایش نفوذپذیری سلول می‌شود [29].

به‌طور خلاصه در این بررسی مشخص شد که توالی پپتیدی الگوبرداری شده از استئوکلسین با مدیفیکاسیون از حالت اسیدی به آمیدی، تشکیل نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت را افزایش می‌دهد. شواهد نشان می‌دهند 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 می‌تواند درک سازوکار مولکولی تشکیل بلور آپاتیت را آسان‌تر 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) Biominerals-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. (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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

[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 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., Virdi, 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., Wadhwani, P., and Ulrich, A. S. (2007) Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

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 Neundorf, I. (2012) Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery. *Beilstein J. Org. Chem.* 8, 1788-1797

[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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]