مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره۴ (شماره پیاپی ۴۵)، زمستان ۱۳۸۷، ۱۰۴-۹۷

ارتباط ساختار-فعالیت در پپتید آنتی باکتریایی آیورین ۱/۲ و آنالوگهایش

صفیه صوفیان[۱]، دکتر حسین نادری منش[۲*]، دکتر عبدالعلی علیزاده[۳]

۱- دانشجوی دکترا بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، دکترا بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، دکترا شیمی، گروه شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۶/۲۷ ، تاریخ پذیرش ۸۷/۸/۱

چکیده

مقدمه: آیورین ۱/۲ یک پپتید ۱۳ آمینه‌ای است که طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتی باکتریایی و ضد سرطانی را نشان می‌دهد. ساختار آن توسط طیف سنجی رزنانس مغناطیسی تعیین شده که مارپیچ آلفا است ولی هنوز مکانیسم عمل آن شناخته نشده است. این مطالعه با هدف تعیین عوامل موثر بر فعالیت پپتیدها و مطالعه ارتباط توالی-فعالیت در پپتید آنتی باکتریایی آیورین ۱/۲ و آنالوگهایش طراحی و انجام گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی دو آنالوگ F3W,G1F3/RW و آنالوگ معکوس طراحی گردید و با روش سنتز شیمیایی فاز جامد ساخته شد و بعد از تخلیص با کروماتوگرافی با فشار بالا، توسط آمینو اسید آنالایزر و طیف سنجی جرمی تائید شد و سپس آزمایش‌های ضد باکتریایی انجام شد.

نتایج: نتایج آزمایش تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که آنالوگ G1F3/RW فعالتر از F3W است و نتایج نمودار آزمایش تعیین حداقل غلظت مهاری برای آنالوگ F3W سه مرحله‌ای است. آنالوگ معکوس هیچ فعالیتی نشان نداد.

نتیجه گیری: فعال‌تر بودن آنالوگG1F3/RW به علت وجود اسید آمینه آرژنین و ایجاد میانکنش قویتر با بار منفی غشاء است. عدم فعالیت آنالوگ معکوس نشان‌گر اهمیت جایگاه اسید آمینه در توالی برای فعالیت است وتوصیه می‌شود در طراحی پپتیدها به عنوان دارو به موقعیت قرار گرفتن اسید آمینه‌ها توجه شود، چرا که اندازه و نوع آمینو اسیدها در تجمع پپتیدها و در نتیجه در نحوه فعالیت ضد باکتریایی موثر است.

واژگان کلیدی: پپتید ضد میکروبی، آیورین ۱/۲،آمینو اسید ، آنالوگ

***نویسنده مسئول:** تهران، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، بخش بیوفیزیک، صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۷۵

Email: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

اخیراً علاقمندی دانشمندان به تحقیق در زمینه حل مشکل مقاومت دارویی آنتی بیوتیک‌ها با استفاده از پپتیدها رو به افزایش است. پپتیدهای ضد میکروبی به خوبی شناخته شده‌اند. صدها نوع از آنها در موجودات زنده کشف شده و تعداد زیادی هم سنتز شده است. در چند دهه اخیرتلاش برای ساخت داروهای جدید با استفاده از پپتیدهای۱۰-۴۰ اسید آمینه‌ای رو به گسترش است. پپتیدهای ضد میکروبی به علت خصوصیات مناسب مثل کشندگی سریع، طیف وسیع فعالیت و پیشرفت نادر مقاومت دارویی مورد توجه زیادی هستند. وجود این خصوصیات پپتیدها به توانایی آنها در چسبیدن به غشاهای باکتریایی نسبت داده می‌شود(۱). خصوصیات ساختاری پپتیدهای ضد میکروبی که نقش مهمی در فعالیت آنها ایفا می‌نماید شامل: گشتاور آبگریزی، ترکیبات آمینو اسیدی، تعداد اسید آمینه‌های باردار، قدرت یونی و قدرت اسمزی، ترکیبات غشاء و سیالیت آن، مقدار بار، توانائی دیمر شدن، مارپیچ بودن، دما، ویسکوزیته، pH محیط، آمفی پاتیسیته(A) ،پتانسیل غشاء(Ψ)،اندازه سطوح هیدروفوبیک، زاویه قطبیت(θ)، کنفورماسیون(X) و آبگریزی است(۵-۲).

پپتیدها به عنوان دارو در طی چند دهه گذشته مطرح شده‌اند ولی به دلایل مختلف مثل هضم توسط پروتئازها، انتقال کم از غشاء و انعطاف پذیری بالا، استفاده از آنها به عنوان دارو دارای محدودیت است. از طرف دیگر پپتیدها کاندیداهای خوبی برای دارو هستند، زیرا سوبستراهای طبیعی هستند که به تعدادی از آنزیم‌ها و رسپتورها می‌چسبند. پس بایستی تغییراتی در پپتیدها ایجاد کرد تا خواص دارویی مناسب مثل پایداری متابولیکی، تمایل بالا و اختصاصی بودن برای یک آنزیم یا گیرنده را دارا شوند(۶، ۷). پپتیدها آیورینی (GLFDIIKKIAESF :آیورین ۲/ ۱) که از پوست یک نوع قورباغه استرالیایی استخراج شده‌اند طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد سرطانی را نشان می‌دهد. آیورین ۱/۲ کوچک‌ترین پپتید ضد سرطان است که در محلول حاوی ۳۰ درصد تری فلورواتانول دارای ساختار مارپیچ آلفا است(۸). ساختار آیورین ۱/۲ توسط طیف سنجی رزنانس مغناطیسی در سال۲۰۰۰ مشخص شد. این پپتیدیک دوگانه دوست مارپیچ آلفا با مناطق آبگریز و آبدوست معین است. رزک و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داند که فنیل آلانین شماره ۱۳ در این پپتید برای فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطانی الزامی است(۹). در سال ۲۰۰۳ سپارورویک و همکاران با روش‌های طیف سنجی رزنانس مغناطیسی هسته‌ای و طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی نشان دادند(۱۰) که آیورین ۱/۲ با ساختار مارپیچ آلفا و زاویه تقریبا ۵۰ درجه به سطح دو لایه غشاء نزدیک می‌شود (شکل۱-۱۰). فنیل آلانین شماره ۳ و۱۳ بیش از ۵۰ درصد سطوح در دسترس آیورین ۱/۲ را نشان می‌دهند که نشان‌گر اهمیت آنها در پیوند شدن به غشاء است. این پپتید ساختار مارپیچ آلفا دارد و به علت کوچک بودن پیچیدگی کمتری داشته و در نتیجه از دیدگاه بیوفیزیکی نیز برای مطالعه ساختاری مناسب است(۱۱). خصوصیات منحصر بفرد این پپتید توجه دانشمندان از کشورهای مختلف جهان را جلب کرده است و زمینه تحقیقات ایمونولوژی و فیزیولوژی را فراهم آورده و منجر به ساخت و بررسی آنالوگ‌های مختلفی با تغییر اسید آمینه‌ها گردیده است. اهمیت ساخت پپتیدهای داروئی نیاز به تحقیقات بیشتر در این مورد را پر واضح می‌نماید. با توجه به اطلاعات موجود با تغییر در جهت توالی یا تغییر اسید آمینه‌های آبگریز بر آنیم که با طراحی و سنتز آنالوگ‌های پپتید آیورین ۱/۲ برای اولین بار به بررسی فعالیت آنالوگ‌های طراحی شده بپردازیم. این امر موجب شناخت بیشتر عوامل دخیل در فعالیت این پپتید گردیده و امکان تغییرات هوشمندانه در آن را فراهم می‌سازد به گونه‌ای که به عنوان یک پپتید داروئی مورد استفاده قرار گیرد.

هدف مطالعه حاضر، تعیین عوامل موثر بر فعالیت پپتیدها و مطالعه ارتباط توالی و فعالیت در آیورین ۱/۲ است.

روش کار

در این مطالعه در آنالوگ اول برای بررسی نقش فنیل آلانین شماره ۳ فنیل آلانین را به تریپتوفان تبدیل کردیم و در آنالوگ دوم برای افزایش فعالیت، اسید آمینه گلیسین را به آرژنین تبدیل کردیم. در آنالوگ سوم جهت اسید آمینه‌ها را تغییر دادیم تا به بررسی تاثیر جهت توالی در عملکرد و ساختار این پپتید ضد باکتریایی بپردازیم. اسید آمینه‌های محافظت شده، رزین، و همه واکنشگرهای سنتزی از شرکت باخم (آلمان) خریداری شد. تمام مواد شیمیایی خلوص بیش از ۹۹ درصد داشتند. پپتیدها توسط فاز جامد با استفاده از رزین ۲-کلروترتیل با روش فلورنیل متوکسی کربونیل ساخته شدند. همه پپتیدها به صورت دستی در یک ظرف شیشه‌ای سنتز شد. کوپل کردن اسید آمینه‌ها با استفاده از ا-بنزوتریازول-۱-ان-ان –تترامتیلاورانیوم تترافلوروبورات و ان –اتیل دی ایزوپروپیل آمین انجام شد. برای حفاظت زدایی از محلول ۲۰ درصد پی پیریدین در دی متیل فرمامید استفاده شد. اتمام کوپلینگ با تست کایزر دنبال شد. پپتید نهایی توسط تری فلورو استیک شکسته شد(۱۶-۱۲). پپتیدها توسط ستون C18 با استفاده از گرادیان استونیتریل – آب دارای ۰/۱ درصد تری فلورو استیک اسیدخالص شد و سپس تحت خلا خشک شد.خلوص ۹۵ درصد توسط ستون C18 آنالیتیکال تائید شد. وبا استفاده از آنالیز اسید آمینه‌ای و طیف سنجی جرمی (سوئد، دانشگاه اوپسالا) سنتز پپتیدها تائید شد(۱۹-۱۷). فعالیت آنتی میکروبیال با استفاده از روش رقیق سازی استاندارد آنالیز شد. محیط کوچکی از باکتری‌های لیستریا مونو سیتوژنیس(ATCC1163)، لوکونوستوک مزونتیروئید (ATCC1059) و استافیلوکوکوس -اپیدرمیدس (ATCC1114) یک شب رشد داده شد. یک مقدار از محیط کشت تازه رشد داده شده با محیط کشت مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شد تا به مرحله لگاریتمی و غلظت برابر 9×10^{8} سلول در هر میلی لیتر رسید(مقدار جذب تقریباً ۰/۵است). سپس محیط کشت رقیق شد تا به جذب حدود ۰/۰۰۱ رسید که معادل[۶] ۱۰ سلول در هر میلی لیتر است. در هر چاهک از ظرف ۹۶ خانه‌ای ۹۰ میکرو لیتر از محیط مایع ریخته شد.۱۰ میکرولیتر از پپتید در غلظت‌های متفاوت (پنج بار برای هر نمونه) به چاهک‌ها اضافه شد. به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس مقادیر جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر در الایزاریدر خوانده شد(۲۰).

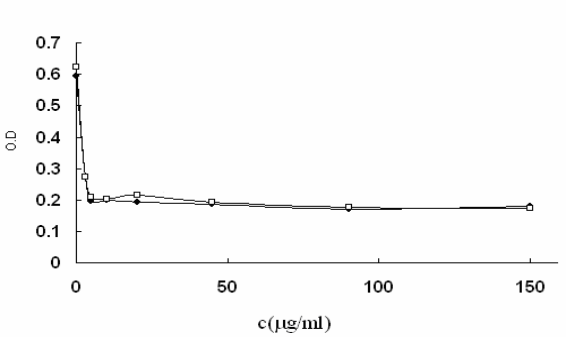
نتایج

نتایج تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که به ترتیب آیورین ۱/۲ در ۲۲ میکروگرم در میلی لیتر و آنالوگ F3W در۲۰ میکروگرم در میلی لیتر و آنالوگ G1F3/RW در ۱۰ میکروگرم در میلی لیترقادر به از بین بردن بیش از نیمی از باکتری‌ها شده‌اند و برای آنالوگ معکوس این مقدار در حدود ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر است که می‌توان گفت فعالیتی ندارد.

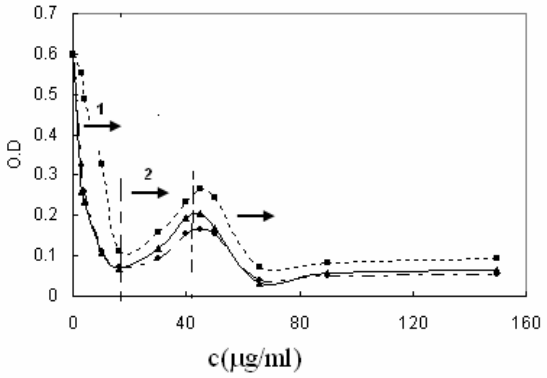
شاخص های بیوفیزیکی و ضد میکروبی پپتید آیورین ۱/۲ و آنالوگ های آن هم‌چنین زمان خروج نمونه (برحسب دقیقه) در دماهای متفاوت (برحسب سانتی گراد) در کروماتوگران با فشار بالا در جدول ۱ نشان داده شده اند. نمودارهای تعیین حداقل غلظت مهاری د ر شکل ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که درشکل ۱ دیده می‌شود آنالوگ G1F3/RW در ۱۰ میکروگرم در میلی لیتربیش از نیمی از باکتری‌ها را از بین برده است. آنالوگ معکوس فعالیت ناچیزی در حدود ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان می‌دهد که عملا غیر فعال محسوب می شود. در آنالوگ G1F3/RW الگوی فعالیت سه مرحله‌ای است. در اولین گام افزایش غلظت آنالوگ F3W منتهی به کاهش شدید در مقادیر جذب شده است. در دومین گام اثر کشندگی پپتید کاهش می‌یابد و در سومین گام اثر بازدارندگی پپتید مجددا بر می‌گردد (شکل ۲).

جدول ۱. شاخص‌های بیوفیزیکی و ضد میکروبی پپتید آیورین ۱/۲ و آنالوگ‌های آن: زمان خروج نمونه(برحسب دقیقه) در دماهای متفاوت(برحسب سانتی گراد) در کروماتوگرافی با فشار بالا

نام	توالی	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	حداقی غلظت مهاری	زمان خروج نمونه در دمای ۱۷°	زمان خروج نمونه در دمای ۲۵°	زمان خروج نمونه در دمای ۲۸°
آیورین ۱/۲	GLFDIIKKIAESF	۱۴۸۰	۶/۹۷	۲۲	۸۹	۶۰	۷۰
F3W	GLWDIIKKIAESF	۱۵۱۹	۶/۹۷	۲۰	۹۰	۶۰	۷۰
G1F3/RW	RLWDIIKKIAESF	۱۶۱۸	۹/۹۴	۱۰	۶۰	۵۹	۵۸
آنالوگ معکوس	FSAIKKIIDFLG	۱۴۸۰	۶/۹۷	۱۵۰	–	–	–



شکل۱. نتایج آزمایش آنتی باکتریال برای آنالوگ G1F3/RW:افزایش در غلظت پپتید با عث کاهش مقادیر جذب شده است.



شکل۲. نتایج آزمایش آنتی باکتریال برای آنالوگ F3W:افزایش در غلظت پپتید(فاز۱) تا ۲۵ میکروگرم در میلی لیترباعث کاهش مقادیر جذب می‌شود ولی در غلظت‌های بیشتر باعث افزایش مقادیر جذب می‌شود(فاز۲)، و در واقع اثرات کشندگی پپتید کاهش می‌یابد ودر غلظت‌های بالاتر از ۴۵ میکروگرم در میلی لیتر،کاهش در جذب دیده می‌شود (فاز۳) که نشان‌گر فعالیت مجدد پپتید است.

بحث

هر دو آنالوگ F3W و G1F3/RW الگوی یکسانی را برای هیدروفوبیسیته اشان نشان می‌دهند و تنها تفاوت بین آنها در داشتن یک بار مثبت در G1F3/RW است. می‌توان گفت بار مثبت مربوط به رزیدو آرژنین باعث میانکنش با سرهای قطبی غشاء می‌شود و چون این پپتید کوچک است، احتمالاً از طریق مکانیسم غوطه ور شدن (Snorkellin) باعث تخریب غشاء می‌شود. در این مکانیسم اسید آمینه‌های باردار مثبت مثل آرژنین و لیزین از طریق زنجیره‌های کناری باردار با سرهای قطبی واکنش می‌دهند و اجازه می‌دهند سطوح هیدروفوبیک به داخل غشاء لیپیدی نفوذ کند(۲۱). اسید آمینه آرژنین یک گروه گوانیدین دارد که ساختار پهن دارد و بار مثبت را بیشتر پخش کرده است. علاوه بر آن این اسید آمینه امکان تشکیل پیوندهای هیدروژنی را بیشتر می‌کند و امکان پیوند با گروه‌های منفی فسفولیپید بیشتر است. علاوه بر این زمان خروج نمونه در G1F3/RW (۵۸ دقیقه) کوتاه‌تر از زمان خروج در F3W(۷۰ دقیقه) است. می‌توان ستون C18 را به عنوان مدلی از غشاء در نظر گرفت(۲۲) که طبق این مدل زمان خروج طولانی‌تر نشان‌گر میان کنش قوی‌تر هیدروفوبیک بین ستون و پپتید است و می‌توان گفت زمان خروج طولانی‌تر در F3W مربوط به عدم وجود اسید آمینه آرژنین در این آنالوگ است. در حالی که در آنالوگ G1F3/RW این روند مشاهده نمی‌شود. از طرف دیگر زمان خروج نمونه F3/W در دماهای متفاوت خطی نیست. با افزایش دما از

۱۷ به ۲۵ زمان خروج طولانی‌تر می‌شود در حالی که در آنالوگ G1F3/RW با افزایش دما، زمان خروج نمونه آنالوگ معکوس از ستون C8 با شیب ۰/۵ درصد در کروماتوگرافی با فشار بالا کوتاه‌تر می‌شود و به صورت خطی تغییر می‌کند.

لی و همکاران ثابت کردند که پپتیدهای آمفی پاتیک پتانسیل بالایی برای خود تجمعی دارند و این موضوع با کاهش زمان خروج در HPLC نشان داه شده است. در دمای پائین ارتباطی غیر خطی بین زمان خروج پپتید و دما وجود دارد(۲۲). نتایج نشان می‌دهد که زمان خروج آنالوگ F3W با افزایش دما افزایش پیدا می‌کند که این نشان‌دهنده خود تجمعی پپتید است. یعنی این پپتید با تغییر یک آمینو اسید از مکانیسم فرشی (carpet) برای عملکرد استفاده می کند. در این مکانیسم، تجمع پپتیدها شرط لازم است. هر چند که تریپتوفان مثل فنیل آلانین در کتاب‌ها به عنوان اسید آمینه آبگریز در نظر گرفته شده است ولی در مقایسه با زنجیره کناری فنیل آلانین، تریپتوفان یک دی پل قابل توجه و گشتاور چهار قطبی دارد که باعث می شود توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی را داشته باشد(۲۳) و انتظار می رود که فعالیت تا حدی بهبود یابد. از طرف دیگر با تغییر اسید آمینه فنیل آلانین شماره ۳ به تریپتوفان تغییر چندانی درمیزان فعالیت و الگوی رفتاری این آنالوگ دیده نمی‌شود. وانگ و همکاران نشان دادندکه جانشین سازی فنیل آلانین ۱۳ با تریپتوفان علیرغم انتظارشان کاهش شدیدی در فعالیت ضد میکروبی بروز می‌دهد بدون این که تغییری در ساختار سه بعدی نشان دهد(۱۱). می‌توان گفت فنیل آلانین شماره ۳ و ۱۳ به علت سطوح هیدروفوب در دسترس نقش مهمی در فعالیت دارند ولی موقعیت قرار گرفتن آنها هم مهم است به طوری که وجود تریپتوفان در انتهای C ترمینال آیورین ۱/۲ از خود تجمعی آن جلوگیری می‌کند. چون تریپتوفان از فنیل آلانین حجیم‌تر است و یک مقدار بهینه اندازه برای کنترل دوپاره شدن(Dimerization) لازم است تا فعالیت ضد میکروبی پپتید حفظ شود. یعنی با این که سطح هیدروفوب فنیل آلانین شماره ۳ هم به اندازه فنیل آلانین شماره ۱۳ است ولی تغییر در آن مشابه نتیجه کار وانگ و همکاران نیست. این امر نشاندهنده اهمیت موقعیت استراتزیک در فعالیت پپتیدها است و بر اساس این پیشنهاد می‌توان نتیجه گرفت که کاهش فعالیت ضد میکروبی این موتانت در کار آنها به کاهش پتانسیل پپتید برای خود تجمعی مرتبط است.

به نظر می‌رسد تعویض فنیل آلانین در موقعیت شماره ۳ توالی و در انتهای N ترمینال با تریپتوفان تاثیری در تجمع پپتید نمی‌گذارد وبه اندازه موقعیت شماره ۱۳ و c ترمینال مهم نیست. یعنی علاوه بر ترکیبات امینو اسیدی جایگاه قرار گرفتن آنها هم در فعالیت موثر است. در آنالوگ معکوس هم که ترکیبات آمینو اسیدی در آن حفظ شده و تنها جهت تغییر کرده است، پپتید فعالیت خود را از دست داده است. یعنی در فعالیت پپتید و مکانیسم عمل آنها جایگاه قرار گرفتن اسید آمینه ها مهم است و در فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی باید به این مورد هم توجه کرد.

نتیجه گیری

با هدف بهبود فعالیت آیورین ۱/۲ سه آنالوگ طراحی و سنتز شد. نتایج نشان داد که وارد کردن اسید آمینه باردار مثل آرژنین باعث افزایش فعالیت می‌شود و غیر فعال بودن آنالوگ معکوس نشان می‌دهد که جهت توالی در عملکرد این پپتید موثر است و علاوه بر تمامی عوامل موثرذکر شده بر فعالیت پپتیدها، موقعیت قرار گرفتن اسید آمینه‌ها نیز مهم است و جایگاه‌های فعالی را برای پپتید هم می‌توان در نظر گرفت. بهبود نسبی فعالیت در آنالوگ F3W نیز بیان‌گر اهمیت جایگاه فعال است وپیشنهاد می‌شود برای بهبود فعالیت به تغییر اسید آمینه‌ها در طراحی دارو و به موقعیت‌های استراتژیک مثل c ترمینال توجه بیشتری شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و مرکزصنایع و معادن نوین که در اجرای این طرح پژوهشی همکاری نمودند تقدیر و سپاسگذاری می‌شود.

منابع

1. Thomas B. From production of peptides in milligram amount for research to multitons quantities for drugs of the. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2004; 5: 29-43
2. Kaur K, Wishart S, Vederas J. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: Temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. Biochemistry. 2004; 43 (43): 9009-9020
3. Zelezetsky IG. Alpha-helical antimicrobial peptides-using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 1758: 1436-1449.
4. Phil C, Biggin M. Interactions of a-helices with lipid bilayers: A review of simulation studies. Biophysical Chemistry. 1999; 76: 161-183.
5. Seelig J. Thermodynamic of lipid-peptide interaction. Biochemica et Biophysica Acta. 2004; 1666(1-2):40-50.
6. Goodman M. Synthesis of peptides and peptidomimetics. workbench ed. Houben-Weyl; 2005.
7. Gnanakaran H, Portman J. Peptide folding simulations. Current Opnion in Structural Biology 2003; 13: 168-174.
8. Rozek T, Bowie JH, Wallace JC, Tyler MJ. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom 2000; 14: 2002-2011.
9. Rozek T, Bowie JH, Olver LN, Carver JA, Wallace JC, Tyler MJ. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis the solution structure of aurein 1.2. Eur J Biochem 2000; 267: 5330-5341
10. Sarah R. Dennison L. Are oblique orientated a-helices used by antimicrobial peptides for membrane invasion? Protein & Peptide Letters. 2005; 12: 27-29.
11. Peterkofsky LI, Wang G. NMR studies of aurein 1.2 analogs. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes. 2006; 9(1758):1203 – 1214.
12. ChemPep Protocol [on line][Cited 2008 Oct 21]. Florida: Available at: http://www.chempep.com/ChemPep-Boc-Solid-Phase-Peptide-Synthesis. htm.
13. Abelson J .Methods in Enzymology:solid-phase peptide synthesis. 1th ed. Academic Press; Vol. 289. 2001.
14. Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT. Short Protocols in Protein Sciene, 9th ed. New York: John Wiely and Sons; 2005. P. 540-541.
15. Fields GB, Tian Z, Barany G. Synthetic peptide: a user's guide.3th ed. New York: 1992.
16. Furka A, Sebestyen F, Asgedom M, Dibo G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. Int J Peptide Protein Res. 1991; 37: 487–493.
17. Aguilqr MI, Hplc of peptides and proteins: Methods and protcols. Methods in Molecular Biology. 2003; 259: 120-121.
18. Kaltashov IA, Eyles SJ. Mass spectrometry in biophysics: conformation and dynamics of biomolecules. New York: John Wiley & Sons. 2005.
19. Smith BJ. AAA, postcolumn amino acid analysis. Methods in molecular biology: protein sequencing protocols. 1997; 64 (64): 139–146.
20. Hancock B. First Gordon conference on antimicrobial peptides[on line][cited 1998Dcc 10]; 1996 .Available at:http://cmdr.ubc.ca/ bobh/ methods/modifiedmic.html.
21.Segrest JP, Venkatachalapathi YV, Srinivas SK, Gupta KP, Deloof H, Anantharamaiah GM. Role of basic amino acid residues in the amphipathic helix: The snorkel hypothesis. Molecular Conformation and Biological Interactions. 1991; 269:7185-7191.

22. Lee MC, Hodges RS. A novel method to measure self-association of small amphipathic molecules: temperature profiling in reversed-phase chromatography. J Biol Chem 2003; 25: 22918-22927.

23. Subalakshmi CE, Bikshapathy E, Sitaram N, Nagaroj R. Antibacterial and hemolytic activities of single tryptophan alogs of indolicidin. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 274: 714–716.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Winter 2009; 11(4): 97-104

Original Article

Sequence –activity relationship study of the antibacterial peptide (aurein1/2) and its analogs

Sofian S[1], Nadri Manesh H[2*], Alizadeh A[3]

1- PhD Candidate of Biophysic, Biophysic Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Professor, Biophysic Depatrment, Tarbiat Modres University, Tehran, Iran.
3- Associate professor, Chemist, Tarbict Modares University, Tehran, Iran.

Received 22 Oct, 2008 Accepted 17 Sep, 2008

Abstract

Background: Aurein 1/2 is a 13-residue peptide with a vast antimicrobial and anticancer activity. Two- dimensional NMR spectroscopy of peptide solubilized in the 70% TFE (2, 2, 2-Trifluoroethanol) indicated an alpha-helical conformation. The mechanism of its action is not yet fully recognized. This study was designed to improve the antimicrobial activity and relationship between subsequence-activity in Aurein 1/2 and its analoges. Analogs of this peptide were designed and synthesized.

Methods and Materials: The G1F3/RW and F3W analogs and retro - analog were synthesized with solide phase and purified via HPLC and lyophilized. These analogs were assayed by several methods: amino acid analysis, HPLC, and electrospray mass spectrometry. Then antimicrobial activity of the peptides was assessed by using the standard microdilution susceptibility test.

Results: The data demonstrated that G1F3/RW analog had a higher activity and results of test figure of minimum inhibitory concentration for F3W analog had three levels. But the native, F3W analog and retro-analog was inactive.

Conclusion: The higher activity of G1F3/RW in compare to F3W may be related to the positive charge of Arg that leading stronger interaction with the negative charges on the membrane surface. The result showed that reversed direction of aurein 1/2 significantly effects on activity of the peptide. It is also suggested inactivation of reto-analog amino acid type, position and size should be cautious for peptides designed as drug because it may be effect to control dimerization and maintenance of antimicrobial activity of the peptide.

Key words: Antimicrobial peptides, Retro, Analog, Aurein 1/2, Sequence, Activity

*Corresponding author;
Email: naderman@modares.ac.ir
Address: No: 14115-175, Biophysic Department, Basic Scienc Faclty, Tarhiat Moderes University Gisha Bniedye, Tehran, Iran.