

บทคัดย่อ

เปปไทด์ Heteroscorpine-1 (HS-1) เป็นเปปไทด์ที่ถูกค้นพบจากแมงป่องชนิด *Heterometrus laoticus* หรือแมงป่องช้างในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เปปไทด์ HS-1 จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มของเปปไทด์ลูกผสม โดยมีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ C-Terminal domain คล้ายกับเปปไทด์ในกลุ่ม Cecropin (Cecropin like domain: CLD) และมีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ N-Terminal domain คล้ายกับเปปไทด์ในกลุ่ม Defensin (Defensin like domain: DLD) งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ HS-1 ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์เปปไทด์พบว่าเกิดการสูญเสียปริมาณของเปปไทด์ ทำให้เปปไทด์ HS-1 มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ผลึก ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลึกของอนุพันธ์ CLD และ DLD จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเปปไทด์ พบว่า เปปไทด์ CLD มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ α -helix และ DLD มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet การทดสอบการเปลี่ยนโครงรูปของเปปไทด์โดยการเหนี่ยวนำด้วย phospholipid ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ พบว่า CLD ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างแบบ α -helix แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใด ๆ ในเปปไทด์ DLD ผลการศึกษาการเข้าจับกับเยื่อเซลล์จำลองโดยทำการเลียนแบบเยื่อเซลล์แบคทีเรียพบว่า เปปไทด์ CLD สามารถเข้าจับ และแทรกตัวเข้าไปยังบริเวณ Hydrophobic ของเยื่อเซลล์จำลองได้มากกว่าเปปไทด์ DLD จากการทดลองวิเคราะห์ผลของ intrinsic fluorescence กรดอะมิโนทริปแทนในสายเปปไทด์ โดย Tryptophan Fluorescence Blue Shift assay เมื่อทำการทดสอบการเกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์ Calcein leakage assay พบว่า CLD สามารถทำให้เกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์มากกว่าเปปไทด์ DLD ผลการทดสอบ Membrane fluidity โดยอาศัย Fluorescence anisotropy พบว่า CLD สามารถแทรกตัวผ่านเข้าไปยังชั้น Hydrophobic ของเยื่อเซลล์ได้ ส่วน DLD จะเกิดการวางตัวอยู่บนผิวของเยื่อเซลล์ ค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิคแสดงการจับแน่นของเปปไทด์ทั้งสอง จาก ITC พบว่า CLD (K_a 2.4×10^7) มีค่าการจับแน่นบนเยื่อเซลล์มากกว่า DLD (K_a 5.9×10^4) ที่ระดับความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากัน และจากการทำนายการเกิดอันตรกิริยาของเปปไทด์ทั้งสองบนเยื่อเซลล์ด้วยวิธี Peptide Simulation พบว่า ส่วนโครงสร้างที่เป็น α -helix ของ CLD สามารถแทรกตัวผ่านเข้าไปยังเยื่อเซลล์ของแบบจำลองได้มากกว่า เปปไทด์ DLD จากคุณลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเปปไทด์ CLD นำไปสู่การเกิดกลไกการทำลายเยื่อเซลล์จุลชีพ และคุณสมบัติพิเศษของการเป็นเปปไทด์ลูกผสมของ HS-1 เป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง domain สองส่วนเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพของการเป็น Antimicrobial peptide ที่ดีในอนาคต

Abstract

Heteroscorpine-1 (HS-1) is a novel antimicrobial peptide isolated and characterized from venom of *Heterometrus laoticus*, Thai giant scorpion. HS-1 belongs to a family of hybrid peptides. The N-terminal domain shares sequence similarity with the insect antimicrobial peptide, Cecropin, and the C-Terminal domain has sequence similar to the human innate defense peptide, Defensin. We designate N- and C-terminus of HS-1 as cecropin-like domain (CLD) and defensin-like domain (DLD), respectively. In this study, this research has been purified peptide HS-1, which is when the purified peptides showed that the loss of the amount of peptide, not enough to analyze the mechanism. Then, we interested to compare CLD and DLD in terms of their binding mechanism to bacterial-mimic model membrane (liposome). Such mechanism is the key factor in determining the domain's biological activity. CLD displayed more compact structure than DLD when placed in membrane-mimicking environment as observed with limited proteolysis and CLD has helical structure but DLD contain β -sheet structure in CD spectra. Whereas, in liposome model membrane, we mimic the bacterial cell membrane instead of the Plasmodium membrane, cell membrane more complicated than bacteria and hardly to mimicking. Circular dichroism spectra titration of CLD and DLD mixing with anionic lipid containing 1:1 mixture of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DMPG) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) suggests that CLD has more helical structure than DLD upon binding to the membrane. Tryptophan Fluorescence Blue Shift assay suggested that CLD deeper penetration of peptide into hydrophobic membrane bilayer than DLD. In part of permeabilization, to determine the mode of action by calcein leakage assay, CLD exerted stronger outer membrane penetration and more permeabilization than DLD. All these results indicate that CLD preferentially interacts with the hydrophobic core of the bilayer where it reduces the order of the phospholipids packing, while DLD locates itself in the hydrophilic part of the model membrane; they imply that N-domain of HS-1 (CLD) leads to model lipid membrane permeabilization. Binding characteristics of CLD correlate well with its biological activity. Separable antimicrobial activity reflects the hybrid nature of scorpine family toxin and its evolutionarily multi-function.