



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์และกลไกการทำลายเชื้อก่อโรคของอนุพันธ์ของ Heteroscorpine-1

Activity and mechanism of action of Heteroscorpine-1

N- and C-terminal domains

นางสาวริษา ภัทรมานนท์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทูสนันสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเมทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปี พ.ศ. 2555

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.

สารบัญ

บทนำ	1	
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง		3
แผนการดำเนินงานโครงการ		16
ผลการดำเนินงานวิจัย		20
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย		30
บรรณานุกรม		32

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การค้นพบยาปฏิชีวนะ และการดื้อยาปฏิชีวนะ	4
ตารางที่ 2 ยาปฏิชีวนะ กลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อยา	7
ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างเปปไทด์ที่มีการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพ	9
ตารางที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โครงสร้างของเปปไทด์ CLD และ DLD ด้วยโปรแกรม CONTIN-LL program	21
ตารางที่ 5 แสดงค่า Fluorescence intensity ที่วัดได้จากเครื่อง Spectrofluorometer เพื่อวิเคราะห์การเกิด Tryptophan Blue-shift assay	24
ตารางที่ 6 ค่าการจัดวางตัวของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์จุลชีพ แสดงค่าพารามิเตอร์ ทาง Simulation ของเปปไทด์ HS-1, CDL (helix-1 และ helix-2) และ DLD	29

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	แสดงตัวอย่างการแพร่กระจายของการดื้อยาปฏิชีวนะ	5
ภาพที่ 2	การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบ Barrel stave model	11
ภาพที่ 3	การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบ Toroidal pore model	12
ภาพที่ 4	การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบ Carpet model	12
ภาพที่ 5	ตัวอย่างลิพโซมชนิด bilayer ชั้นเดียว หรือ Unilamellar liposome	14
ภาพที่ 6	Hydration ของ Lipid Film/Cake	15
ภาพที่ 7	พารามิเตอร์ peptide simulation	19
ภาพที่ 8	กราฟแสดงผล Circular dichroism ของเปปไทด์ CLD และ DLD ใน 10 mM NaHPO ₄ และ 30% TFE	20
ภาพที่ 9	กราฟแสดงผล Circular dichroism titration ด้วย SUVs ลิพโซม DMPG/PC (50:50) ของเปปไทด์ CLD และ DLD	22
ภาพที่ 10	กราฟแสดงผล Secondary structure composition ด้วยโปรแกรม CONTINLL	24
ภาพที่ 11	ผลการวิเคราะห์ % การรั่วของ calcein จาก LUV	26
ภาพที่ 12	กราฟแสดงผล ITC ของเปปไทด์ 35 μ M CLD และ DLD ใน 0.1 mM DMPG/PC (50:50)	28
ภาพที่ 13	แบบจำลองการทำงานของเปปไทด์ HS-1 (full sequence) เปปไทด์ CLD (helix1, helix2) และเปปไทด์ DLD	29

สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 กราฟแสดงผล Secondary structure composition

23

ด้วยโปรแกรม CONTINLL จากการไทเทรต SUVs ลิโปโซม DMPG/PC (50:50)