บทคัดย่อ

รหัสโครงการ 106121

ชื่อหัวข้อวิจัย การใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ศึกษากลไกของ antimicrobial peptides ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, นางสาวนฤมล เผ่านักรบ, นางจันทิมา จเรสิทธิกุลชัย
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
นายวิรัตน์ แดงลาด
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในคน ซึ่งเป็นที่รู้จักโดยทั่วไป และยังคงเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องสำรวจอย่างจริงจังมากที่สุด การดื้อยาปฏิชีวนะเป็นสาเหตุของการเกิดโรครุนแรงและเป็นเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขโดยเฉพาะการดื้อยาเมทิซิลลินของ *S. aureus* เมื่อไม่นานมานี้เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาใหม่ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการดื้อยา ในการศึกษานี้ได้ทำการออกแบบโดยใช้ฐานข้อมูลของ antimicrobial sequence database และ antimicrobial peptide sequence แล้วนำเปปไทด์ทั้งหมดไปสังเคราะห์ จำนวน 21 เส้น หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับ *S. aureus* ATCC 25923 สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 1 สายพันธุ์ และ 3 สายพันธุ์ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (DMST 20635, 20637 และ 20654) โดยวิธี minimum inhibitory concentration (MIC) จากเปปไทด์ทั้งหมดพบว่า เปปไทด์ KLKLLLLLKLK มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน เมื่อทำการดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้พบว่าเปปไทด์ 3 เส้น คือ KLKLKLKLKLK, LLLLLLKLK และ LLLLLLK มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้ประกอบด้วย 6-25 กรดอะมิโน มีประจุบวก และ 40-87 % hydrophobicity จากการทำ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย MALDI Biotyper software พบว่าโปรตีนของเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การเปรียบเทียบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากการทดสอบด้วยเปปไทด์ดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพทั้ง 3 เส้น และยาแวนโคมัยซิน ในการยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ โดยทำการวัดที่ค่า IC_{50} 75 μg/ml และ 3.9 μg/ml ตามลำดับ นำผลของการย่อยโปรตีนจากเจลและ LC-MS/MS ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม MASCOT พบว่าการทดสอบด้วยเปปไทด์ดัดแปลงมีการสังเคราะห์โปรตีนที่สำคัญ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัส โดยที่การทดสอบกับแวนโคมัยซินพบว่าโปรตีนสังเคราะห์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการจับเมมเบรน แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ดัดแปลงมีกลไกที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามข้อมูลยังสนับสนุนกลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียของยาแวนโคมัยซิน จากผลการทดลองนี้เป็นแนวทางในการนำเปปไทด์ดัดแปลงทั้ง 3 เส้น ที่มีประสิทธิภาพนี้ไปพัฒนาเป็นยารักษาที่มีการติดเชื้อ *S. aureus* ที่มีการดื้อยาหลายชนิด

คำหลัก : *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน, เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, โปรตีโอมิกส์

Abstract

Projectcode: 106121

Project Title: The Use of Proteomics Technique for Studying the Mechanism of Antimicrobial Peptides in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Investigators: Assoc. Prof. Dr. Nuanchawee Wetprasit
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.
Dr. Sittiruk Roytrakul, Miss Narumol Phaonakrop,
Mrs. Jantima Jaresitthikunchai
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency.
Mr. Virat Danglad
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

Project Period: 3 years

Staphylococcus aureus is a well-known major pathogen in humans and remains one of the most intensively investigated bacterial species. Antibiotic resistance can cause serious disease and is an important public health problem especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Recently, antimicrobial peptides (AMPs) have been proposed as the new class of antimicrobial therapeutic use for drug resistance. In this study, Twenty-one peptides were designed by using antimicrobial sequence database and antimicrobial peptide database. All of them were chemically synthesized. After that they were evaluated for the antibacterial activity against one standard strain of *S. aureus* ATCC 25923 and three clinical isolates of MRSA (DMST 20635, 20637 and 20654) by minimum inhibitory concentration (MIC). Of these peptides, KLKLLLLLKLK was found to have potent antibacterial activity against *S. aureus* and MRSA. Three chemically synthesized and modified from KLKLLLLLKLK which were KLKLKLKLKLK, LLLLLLKLK and LLLLLLK, showed the most potent antibacterial activity against all *S. aureus*. These peptides contain 6-25 amino acid residues with positive charge and 40-87 % hydrophobicity. Significant differences between *S. aureus* and three clinical MRSA isolates was revealed by means of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling and bioinformatics examination using the MALDI Biotyper

software. Comparison of protein synthesis from treatment of the three potent modified peptides and vancomycin for their ability to inhibit the growth of all *S. aureus* strains were measured at IC_{50} values of 75 μg/ml and 3.9 μg/ml respectively. The results of in gel digestion and LC-MS/MS were analyzed by MASCOT program. Significant transcription and translation proteins were found in treatment of modified peptides whereas membrane bound proteins were existed after treatment with vancomycin. These indicates that modified peptides can interact and inhibit the growth of all *S. aureus* strains. However, the data also supported the bactericidal mechanism of vancomycin. The results suggest that three modified peptide, a potent antibiotic peptide, can be developed as therapeutic agent for treating multidrug-resistant strains of *S. aureus* infection.

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antimicrobial peptides (AMPs), proteomics