

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

خصوصیات بیوانفورماتیکی و دینامیک
مولکولی پپتیدهای ضد میکروبی

مؤلف:

سارا عزیزی شالباف

خصوصیات بیوانفورماتیکی و دینامیک مولکولی پپتیدهای ضد میکروبی

مؤلف: سارا عزیزی شالباف

تهران، نشردا، چاپ اول ۱۳۹۸ / شابک: ۳-۵۸-۶۰۳۵-۶۲۲-۹۷۸

موضوع: زیست انفورماتیک / Bioinformatics

موضوع: زیست شیمی / Biochemistry

رده بندی کنگره: ۲/۳۲۴ QH

رده بندی دیویی: ۵۷۲ / ۸۰۲۸۵

شماره کتابشناسی ملی: ۵۷۰۳۳۳۶

شناسنامه

خصوصیات بیوانفورماتیکی و دینامیک مولکولی پپتیدهای ضد میکروبی

مؤلف: سارا عزیزی شالباف

تهران، نشردا، چاپ اول ۱۳۹۸ / شابک: ۳-۵۸-۶۰۳۵-۶۲۲-۹۷۸

صفحه آرایشی و طراحی جلد: سارا عزیزی شالباف

تیراژ: ۱۰۰۰ / قیمت: ۳۰۰۰۰ تومان

حق چاپ و نشر محفوظ است. طبق حقوق نویسندگان و منصفان هرگونه

کپی برداری به هر روش پیگرد قانونی دارد.

آدرس: میدان انقلاب - خیابان جمالزاده جنوبی - کوچه دانشور - پلاک ۵ - واحد ۸.

تلفن: ۰۲۱۶۶۱۲۶۷۹۴

آدرس الکترونیک: nashrda@yahoo.com

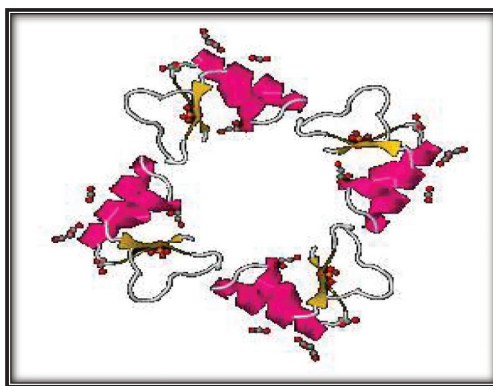
۷	فصل اول: انواع پپتیدهای ضد میکروبی
۷	پپتیدهای ضد میکروبی
۸	منابع مختلف پپتیدهای ضد میکروبی
۸	پپتیدهای ضد میکروب گیاهی
۹	پپتیدهای ضد میکروب استخراج شده از حشرات
۱۰	پپتیدهای ضد میکروب استخراج شده از پستانداران
۱۲	تنوع پپتیدهای ضد میکروبی
۱۲	دسته بندی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ساختار سه بعدی
۱۲	پپتیدهای ضد میکروب با ساختار ماریپچ آلفا
۱۳	پپتیدهای ضد میکروب با ساختار صفحه بتا
۱۴	پپتیدهای ضد میکروب با ساختار ترکیبی ماریپچ آلفا و صفحه بتا
۱۴	پپتیدهای ضد میکروب بدون ساختار ماریپچ آلفا و صفحه بتا
۱۵	مکانیسم عمل پپتیدهای ضد میکروبی
۱۵	مدل شیار بشکه ای
۱۶	مدل فرشی
۱۷	مدل حفره حلقوی
۱۸	استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان دارو
۱۸	مطالعات بیوانفورماتیکی و زیست شناسی محاسباتی
۱۹	پایگاه داده
۲۰	مقدمه ای بر روش های شبیه سازی رایانه ای
۲۱	دینامیک مولکولی
۲۱	کاربرد قانون دوم نیوتون در دینامیک مولکولی
۲۲	الگوریتم ورله
۲۳	شرایط مرزی متناوب
۲۴	کاربرد شبیه سازی دینامیک مولکولی در مطالعه ی پپتیدهای ضد میکروبی
۲۵	برخی نرم افزارهای رایج در شبیه سازی دینامیک مولکولی

۲۵ نرم افزار AMBER
۲۵ نرم افزار CHARMM
۲۵ نرم افزار NAMD
۲۶ نرم افزار GROMACS
۲۷	فصل دوم: بیوانفورماتیک پپتیدهای ضد میکروبی
۲۷ تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پپتیدهای ضد میکروبی
۲۷ پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی
۲۸ گروه بندی پپتیدهای ضد میکروبی در مجموعه داده ها (Datasets)
۲۹ مطالعه و بررسی خصوصیات بیوفیزیکی پپتیدهای ضد میکروبی
۲۹ آنالیز بار پپتیدهای ضد میکروبی
۲۹ آنالیز هیدروفوبیسیته پپتیدهای ضد میکروبی
۲۹ آنالیز طول پپتیدهای ضد میکروبی
۳۰ هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی
۳۰ ساخت فایل ورودی نرم افزار MEGA:
۳۱ هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ساختار سه بعدی
۳۱ هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس فعالیت
۳۳ مطالعه ی بیوانفورماتیکی پپتیدهای ضد میکروبی
۳۳ خصوصیات بیوفیزیکی پپتیدهای ضد میکروبی
۳۳ نتایج حاصل از آنالیز بار پپتیدهای ضد میکروبی
۳۷ نتایج حاصل از آنالیز هیدروفوبیسیته ی پپتیدهای ضد میکروبی
۴۰ نتایج حاصل از آنالیز طول پپتیدهای ضد میکروبی
۴۳ هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی
۴۳ نتایج حاصل از هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ساختار سه بعدی
۴۶ نتایج حاصل از هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس فعالیت
۵۱	فصل سوم: دینامیک مولکولی پپتیدهای ضد میکروبی
۵۱ مطالعه ی دینامیک مولکولی پپتیدهای ضد میکروبی
۵۱ پپتیدهای انتخاب شده برای شبیه سازی اندرکنش پپتید-غشا
۵۱ پپتید ضد میکروبی فیلوسپتین H۳

۵۳ فایل PDB
۵۳ فایل توپولوژی (Topol.top)
۵۳ فایل های MDP
۵۳ مراحل شبیه سازی دینامیک مولکولی
۵۳ ایجاد ساختار اولیه ی شبیه سازی (توپولوژی)
۵۳ آماده سازی ساختار اولیه ی پتیدها:
۵۴ آماده سازی ساختار اولیه دولایه های لیپیدی
۵۴ آماده سازی سیستم ترکیبی پتید-غشا
۵۵ افزودن یون و خنثی سازی سیستم ها
۵۵ حداقل سازی انرژی سیستم ها
۵۶ به تعادل رسانی سیستم ها:
۵۶ هنگرد NVT
۵۶ هنگرد NPT
۵۶ اجرای شبیه سازی نهایی سیستم ها (MD Run)
۶۱ روش های مختلف تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده از شبیه سازی دینامیک مولکولی
۶۱ جذر میانگین مربع تغییرات در ساختار
۶۱ جذر میانگین مربع نوسانات در ساختار
۶۱ میزان تغییرات ساختار ماریچی (DSSP)
۶۱ تعداد پیوندهای هیدروژنی در ساختار (H-Bonds)
۶۲ تابع توزیع شعاعی (RDF)
۶۲ فاصله ی مرکز جرم پتید با مرکز جرم غشا (Distance)
۶۲ مطالعه ی دینامیک مولکولی پتیدهای ضد میکروبی
۶۳ تغییرات دینامیکی و ساختاری پتیدهای ضد میکروبی
۶۳ جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD)
۶۶ جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF)
۶۸ جهت گیری و موقعیت پتیدها
۶۸ چگالی
۷۰ پیوند هیدروژنی

- ۷۵..... تابع توزیع شعاعی (RDF)
- ۷۶..... تغییرات ساختار دوم پپتیدها در طول شبیه سازی (DSSP)
- ۸۱..... فاصله‌ی مرکز جرم چارچوب پپتیدها با مرکز جرم گروه‌های سر لپیدها:
- ۸۲..... تغییرات نظم زنجیره‌های هیدروکربنی لپیدها بعد از ورود پپتیدهای ضد میکروبی:
- ۸۵..... درآمدی بر کتاب
- ۸۵..... مطالعات بیوانفورماتیکی
- ۸۹..... مطالعات دینامیک مولکولی
- ۸۹..... تغییرات دینامیکی و ساختاری پپتیدهای ضد میکروبی
- ۸۹..... موقعیت و جهت‌گیری پپتیدها در غشا
- ۹۰..... تأثیر ورود پپتیدها به غشا بر ساختار غشا

تیونین‌ها اولین خانواده از پپتیدهای ضد میکروبی هستند که از گیاهان استخراج شده‌اند (شکل ۱-۱). بیشتر در بذر گیاهان وجود دارند. دارای ۴۵ الی ۴۸ باقی مانده آمینواسیدی و وزن مولکولی حدود ۵ کیلودالتون، بار مثبت در pH خنثی و نیز سه الی چهار پیوند دی سولفیدی هستند. علاوه بر این‌ها، سرشار از آمینواسیدهای آرژینین، لایزین و سیستئین می‌باشند. دارای فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های گیاهی، باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و برخی سلول‌های پستانداران هستند [۱۰، ۱۴]. ساختار این پپتیدها متشکل از دو مارپیچ آلفای ناهم سوویک صفحه بتا که شامل دوزنجیره بتای ناهم سواست تشکیل شده که توسط پیوندهای دی سولفیدی به هم مرتبط شده‌اند. شیار بین مارپیچ‌های آلفا و صفحه بتا حاوی یک باقی مانده تریپتوفان (Tyr ۱۳) است که در اندرکنش با غشای میکروارگانیسم‌ها شرکت می‌کند و سبب نشت سلول که مکانیسم معمول در لیز سلولی توسط تیونین‌ها است، می‌شود [۱۵]. این خانواده شامل دو گروه است که تحت عنوان آلفا / بتا تیونین‌ها و گاما تیونین‌ها نامیده می‌شوند که گروه گاما خود به پنج زیرگروه دسته بندی می‌شوند [۱۶].

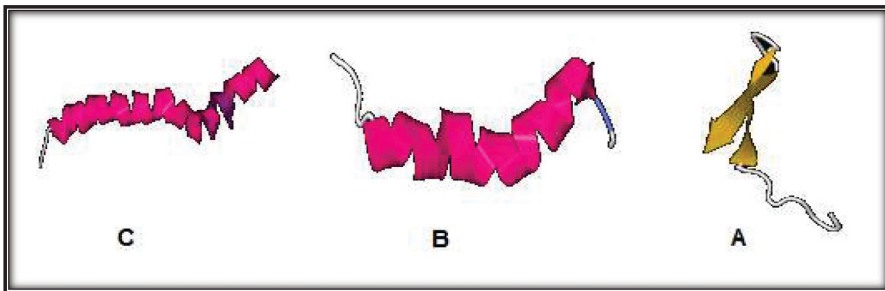


شکل ۱-۱- ساختار سه بعدی پپتید ضد میکروبی بتاپوروتیونین از خانواده تیونین‌ها (www.pdb.org)

پپتیدهای ضد میکروب استخراج شده از حشرات

پپتیدهای ضد میکروبی مختلفی از اورگان‌های داخلی و خارجی حشرات گوناگون استخراج شده‌اند (شکل ۱-۲). حشرات بسته به نوع پاتوژن، پپتیدهای ضد میکروبی متنوعی تولید می‌کنند. زمانی که حشرات دچار دگرذیسی کامل شده‌اند پپتیدهای ضد میکروبی را از اجسام چربی و سلول‌های اپیتلیالی مختلف ترشح می‌کنند و زمانی که دگرذیسی آن‌ها ناقص است این پپتیدها توسط هموسیت‌ها در حیوانات سالم تولید و به همولنف ترشح می‌شود [۱۷]. مگس

سرکه یک موجود مدل ایده‌ال برای درک ترشح این پپتیدها علیه میکروارگانیسم‌های مختلف و بررسی مکانیسم ایمنی ذاتی در حشرات می‌باشد. [۱۸]. از دیگر پپتیدهای ضد میکروبی که در حشرات تولید می‌شود می‌توان به گلورین‌ها^۱، دروسومیسین‌ها^۲، اتاسین‌ها^۳، لیوسین‌ها^۴، موریسین‌ها^۵، اپیداسین‌ها^۶ و... اشاره کرد [۱۹-۲۱]. استوموکسین و اسپینگرین پپتیدهای خطی فاقد سیستمین با فعالیت ضد میکروب علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها، ویروس‌ها و پارازیت‌ها هستند. هر دو پپتید فاقد فعالیت لیتیک علیه اریتروست‌های پستانداران هستند [۲۲]. تاناتین^۷ پپتیدی دیگر از حشرات با ۲۱ آمینواسید است. ساختار آن به صورت صفحه بتای متشکل از دو رشته است که توسط یک یا دو پیوند دی‌سولفید پایدار شده و بسیار شبیه به پپتیدهای گروه برونین پروتگرین و تاجپیل‌سین‌ها است [۲۳].



شکل ۱-۲- نمونه‌هایی از پپتیدهای استخراج شده از حشرات. a. تاناتین b. اسپینگرین c. استوموکسین
(www.pdb.org)

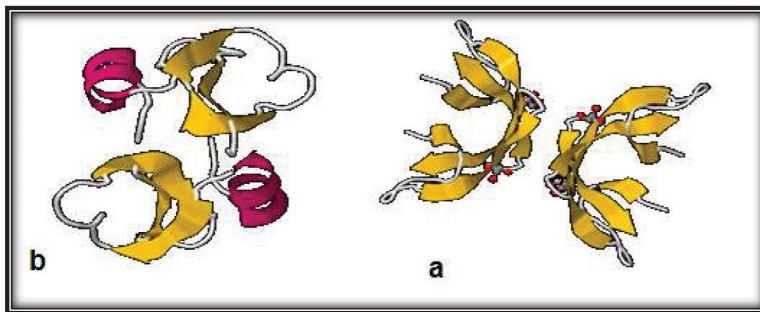
پپتیدهای ضد میکروب استخراج شده از پستانداران

پپتیدهای ضد میکروبی استخراج شده از پستانداران (شکل ۱-۳) می‌توانند در گرانول‌های نوتروفیل‌ها، ترشحات موکوزی و پوستی سلول‌های اپیتلیال و یا محصولی از تخریب پروتئین‌ها باشند [۲۴]. نوتروفیل‌ها حاوی طیف وسیعی از پپتیدهای ضد میکروبی همانند دیفنسین‌ها،

-
1. Gloverins
 2. Drosomysins
 3. Attacins
 4. Lebocins
 5. Moricins
 6. Apidaecins
 7. Thanatins

ایندولیسیدین‌ها، لاکتوفرین‌ها^۲، باکتریوسین‌ها^۳ و... هستند [۲۵]. این پپتیدها به روش‌های مختلف غیر اکسیداتیو سبب ایجاد اختلال در غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها و در نهایت از بین رفتن آن‌ها می‌شوند [۲۶]. دیفنسن‌ها نسبت به دیگر پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است.

دیفنسن‌های موجود در پستانداران به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند، آلفا دیفنسن‌ها و بتا دیفنسن‌ها. این دو گروه از نظر تعداد آمینواسید و محل پیوندهای دی سولفید تفاوت دارند. آلفا دیفنسن‌ها متشکل از ۲۹-۳۳ آمینواسید، سه پیوند دی سولفید در بین سیستئین‌های ۶-۱، ۴-۲، و ۵-۳، در صورتی که بتا دیفنسن‌ها متشکل از ۳۵-۷۲ آمینواسید و سه پیوند دی سولفید بین سیستئین‌های ۱-۵، ۴-۲ و ۳-۶ هستند [۲۷، ۲۸]. مطالعات نشان می‌دهند که موتیف Gly-Xaa-Cys در تمامی دیفنسن‌های پستانداران حفاظت شده است و برای تاخوردگی صحیح و ساختار طبیعی این پپتیدها ضروری می‌باشند [۲۹]. این گروه از پپتیدها علیه میکروارگانیسم‌های مختلفی شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، ویروس‌ها، قارچ‌ها و... فعال هستند. همچنین خاصیت مهار رشد سلول‌های سرطانی از آن‌ها مشاهده شده است. مکانیسم عمل آن‌ها عموماً به این صورت است که در ابتدا پپتید توسط باقی مانده آمینواسیدی آرژنین با اجزای منفی موجود در غشای میکروارگانیسم پیوند الکتروستاتیک برقرار می‌کنند سپس بخش هیدروفوب آن‌ها به داخل غشا وارد می‌شوند و پس از آن چندین مونومر یا دایمر سبب تشکیل منفذی به قطر حدود ۲۵ انگستریم در غشا می‌شوند [۲۸].



شکل ۱-۳. ساختار سه بعدی a. نوعی آلفا دیفنسن. b. بتا دیفنسن انسانی www.pdb.org

-
1. Indolicidins
 2. Lactoferrins
 3. Bacteriocins

به دلیل اینکه به دست آوردن یک تصویر کامل از فعل و انفعالات مولکولی در یک آزمایش عملی مشکل است، کارهای محاسباتی نه تنها قدرت تفسیر نتایج مشاهده شده را دارند بلکه در هدایت آزمایش های آینده تأثیرگذار می باشند. شبیه سازی دینامیک مولکولی^۱ (MD) به یک ابزار مهم در مطالعه ی مولکول های زیستی تبدیل شده است و مدل اتمی واضحی برای سیستم مورد نظر ارائه می دهد. روش های فعلی دارای قدرت محاسباتی برای شبیه سازی سیستم های چندین میلیون اتمی (به اندازه کافی بزرگ برای اکثریت پروتئین های مورد نظر) برای صدها نانو ثانیه هستند [۶۲].

دینامیک مولکولی^۲

حدود چهار دهه است که از اولین شبیه سازی دینامیک مولکولی می گذرد و در طول این مدت به یک ابزار کاربردی و تکمیل کننده روش های آزمایشگاهی برای مطالعه ی ساختار مولکول های زیستی تبدیل شده است. هم اکنون این روش در سه زمینه کاربرد فراوان دارد، ۱. از این روش در به دست آوردن ساختار طبیعی مولکول های زیستی استفاده می شود، دینامیک طبیعی مولکول های زیستی در حالت محلول در مقیاس های زمانی مختلف، ۲. به وسیله ی دینامیک مولکولی می توان مولکولی را همراه با محیط اطرافش در یک بازه زمانی خاص شبیه سازی کرد و تغییرات خصوصیات مختلف آن را در این بازه زمانی به دست آورد. این مورد برای مثال، برای محاسبه ی اختلاف انرژی فرایند شیمیایی چون اتصال لیگاند به کار می رود. ۳. این روش می تواند هر نوع کانفورماسیونی از مولکول یا کمپلکس را که از نظر دمایی مطلوب و قابل قبول است را آشکار سازد. این مورد برای مثال در داکینگ لیگاندی کاربرد دارد. بنابراین اگر از اطلاعات بدست آمده از روش های آزمایشگاهی (XRD و NMR) به عنوان نقطه ی شروعی برای محاسبات دینامیکی استفاده شود، دینامیک مولکولی به راحتی می تواند داده های آزمایشگاهی را با اطلاعات مربوط به تمام خصوصیات ساختار مولکولی که در هزاران پارامتر موجود در یک میدان نیروی مکانیک مولکولی درج شده است، ترکیب کند. از برتری هایی که دینامیک مولکولی نسبت به روش مونت کارلو دارد این است که با داشتن ویژگی هایی به خصوصیات دینامیکی سیستم مسیر می دهد و نیز زمان را هم در نظر می گیرد.

کاربرد قانون دوم نیوتون در دینامیک مولکولی

در دینامیک مولکولی پیکربندی موفق یک سیستم با انتگرال گیری قانون حرکت نیوتون به دست می آید. نتیجه، ترازکتوری^۳ است که چگونگی تغییرات موقعیت و سرعت ذرات در سیستم را با زمان نشان می دهد. قانون حرکت نیوتون به صورت زیر توصیف می شود:

1. Molecular Dynamic simulation
2. Molecular Dynamic
3. Trajectory

یک جسم به حرکت خود در یک خط مستقیم با سرعت ثابت ادامه می‌دهد تا نیروی روی آن عمل کند.

نیرو برابر نرخ تغییر حرکت است.

در مقابل هرکنشی یک واکنش دقیقاً برابر با آن ولی در خلاف جهت وجود دارد.

تراژکتوری از طریق حل معادلات دیفرانسیلی درج شده در قانون دوم نیوتون ($F=ma$) به دست می‌آید:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i}$$

این معادله حرکت ذره‌ای به جرم m و نیروی F_{X_i} اعمال شده روی آن در طول محور (X_i) را نشان می‌دهد [۸۸].

الگوریتم ورله

در دینامیک مولکولی، معادلات نیوتنی حرکت با استفاده از روش تفاضل محدود انتگرال‌گیری شده‌اند. با این حال، از آنجا که سیستم شامل تعداد زیادی ذرات است، انتخاب الگوریتم‌های مناسب بسیار محدود است. چندین شرط برای انتخاب الگوریتم مناسب اعمال شده است. در میان آن‌ها، مهم‌تر از همه، این است که الگوریتم سریع است و به خوبی انرژی کل را حفظ کند. الگوریتم ورله یکی از این الگوریتم‌های مطلوب است. برای اولین بار توسط Verlet در سال ۱۹۶۷ برای یک سیستم لنارد جونز به کار برده شد و تاکنون نیز متداول‌ترین روش انتگرال‌گیری از معادلات حرکت در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است.

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \delta t^2 \frac{\mathbf{f}_i(t)}{m_i}, \quad i = 1, 2, \dots, N$$

که $\mathbf{f}_i(t)$ برابر است با:

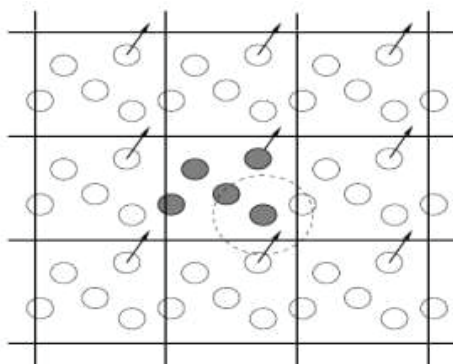
$$\mathbf{f}_i(t) = -\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} U\left(\sum_{j=1}^N \mathbf{r}_j\right)$$

نیروی کل وارد بر ذرات i ام است و t گام زمانی برای هرانتگرال است. توجه داشته باشید که، در این شکل از الگوریتم ورله مؤلفه سرعت با انتگرال‌گیری حذف شده است. با استفاده از رابطه‌ی زیر می‌توان سرعت‌ها را به دست آورد [۸۹]:

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)}{2\delta t}$$

شرایط مرزی متناوب^۱

برای آنکه بتوان در یک شبیه‌سازی با استفاده از تعداد نسبتاً کمی از ذره‌ها خواص ماکروسکوپی سیستم را محاسبه کرد. باید مرزها و اثرات مرزی به درستی در نظر گرفته شود. به کمک شرایط مرزی متناوب می‌توان با استفاده از تعداد نسبتاً کمی از ذره‌ها یک شبیه‌سازی را به‌گونه‌ای انجام داد که نیروهای وارد بر ذره‌ها مشابه شرایط توده یک سیال واقعی باشد. یک جعبه مکعبی محتوی ذره‌ها در نظر بگیرید (شکل ۱-۸) که تا بی‌نهایت در تمام جهات فضا تکرار شده و یک ارائه متناوب را تولید کرده است، یعنی جعبه مرکزی به وسیله‌ی ۲۶ جعبه یکسان احاطه شده است که دویار با ۹۸ جعبه احاطه می‌شود، و به همین ترتیب الی آخر، اگر در حین شبیه‌سازی ذره‌ای جعبه را ترک کند، یک ذره مجازی از وجه مقابل جعبه وارد و جایگزین این ذره می‌شود. بنابراین تعداد ذره‌ها یا دانسیته تعداد در جعبه مرکزی ثابت می‌ماند. سلول مکعبی ساده‌ترین سیستم متناوب است که تجسم و برنامه‌سازی آن به راحتی امکان پذیر است. با این حال ممکن است از جعبه‌های با اشکال دیگر در شبیه‌سازی ایجاد شود. در واقع هر شکلی که در اثر اعمال انتقالی در سه بعد، تمام فضا را پر می‌کند، می‌تواند برای سلول شبیه‌سازی استفاده شود. پنج شکل مکعب، منشور شش‌گوشه‌ای، هشت‌وجهی لبه پهن، دوازده‌وجهی لوزی شکل، دوازده‌وجهی کشیده شده دارای این ویژگی می‌باشند [۹۰].



شکل ۱-۸- شرایط مرزی متناوب. همچنان که ذره‌ای از جعبه شبیه‌سازی خارج شود، ذره‌ی دیگری جایگزین آن می‌شود. و هر دو ذره در محاسبه‌ی اندرکنش‌ها به حساب می‌آیند.

فصل دوم

بیوانفورماتیک پپتیدهای ضد میکروبی

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پپتیدهای ضد میکروبی

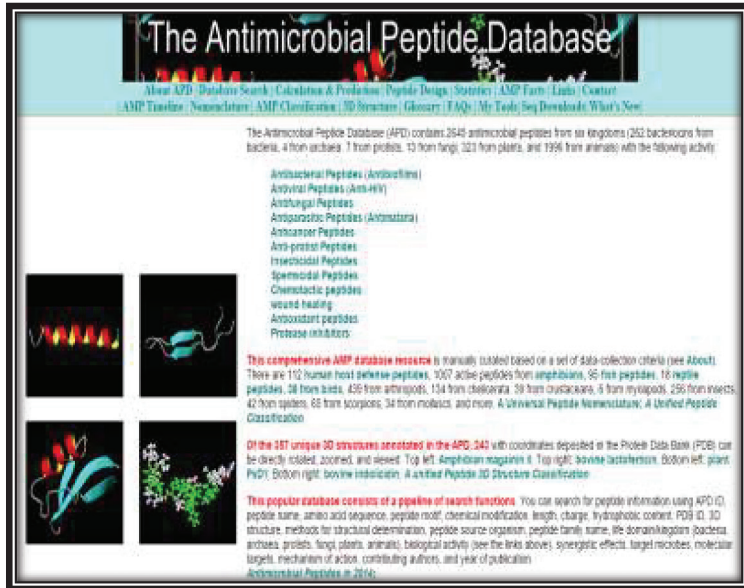
همان طور که در مقدمه اشاره شد، بخشی از مطالعات بیوانفورماتیکی شامل مطالعه‌ی آماری پدیده‌های زیستی مختلف است. برای مطالعات آماری نیاز به وجود داده‌های مستند و تجربی فراوان می‌باشد. داده‌هایی که بتوان به آن‌ها تکیه کرد و براساس آن‌ها نظریه‌پردازی کرد. پپتیدهای ضد میکروبی نیز از این قاعده مستثنا نیستند. برای مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی این پپتیدها نیاز به داده‌ی تجربی فراوان است. چندین پایگاه داده وجود دارند که مشخصات و خصوصیات پپتیدهای ضد میکروبی که به صورت تجربی به دست آمده‌اند را در خود ذخیره دارند. در پژوهش‌های مختلف در این پایان‌نامه، به یکی از معتبرترین پایگاه‌های داده مراجعه شده و از پپتیدهای موجود در آن استفاده شده است. این پایگاه داده تحت عنوان پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی (APD) (Antimicrobial peptide database) به آدرس (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) است.

پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی ۱

در این پایگاه داده (شکل ۲-۱) حدوداً ۲۵۰۰ پپتید ضد میکروبی وجود دارد که خصوصیات مختلف آن‌ها به صورت تجربی مطالعه شده است. این پایگاه داده هم محتوی پپتیدهای طبیعی و هم سنتزی است و نیز می‌توان توالی خاصی را به این پایگاه داد و برای آن ساختار سوم پیش‌بینی کرد. در این پایگاه داده می‌توان پپتیدهای ضد میکروبی را براساس ساختار سه بعدی خاص (مارپیچ آلفا، صفحات بتا، تعداد پیوندهای دی سولفیدی موجود در ساختار آن‌ها و...)، براساس فعالیت‌های مختلف (ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، ضد پارازیت، ضد سرطان و...)، براساس خصوصیات بیوفیزیکی (بار، هیدروفوبیسیته، طول)، براساس روش‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه (کریستالوگرافی اشعه X، NMR، CD) و دیگر فاکتورهای مورد نظر دیگر جستجو کرد. علاوه بر این‌ها، در این پایگاه داده امکان جستجوی موتیف یا توالی عملکردی

1. Antimicrobial peptide database

خاصی در ساختار پپتیدها وجود دارد. از دیگر امکانات این پایگاه این است که علاوه بر اینکه خودش محتوی پپتیدهای ضد میکروبی است، به پایگاه‌های داده‌ی پپتیدهای ضد میکروبی دیگر نیز مرتبط است [۱، ۹۸، ۹۹].



شکل ۲-۱- تصویری از اولین صفحه پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی

گروه‌بندی پپتیدهای ضد میکروبی در مجموعه داده‌ها (Datasets):

برای این منظور، پپتیدهای ضد میکروبی موجود در این پایگاه داده بر اساس ساختار سه بعدی و فعالیت‌های مختلف جستجو، دسته‌بندی و استخراج شدند. بر اساس ساختار سه بعدی، پنج مجموع داده (Datasets) پپتید شامل ماریچج آلفا^۱ (۳۴۴ عدد پپتید)، صفحات بتا^۲ (۹۹ عدد پپتید)، پپتیدهای سرشار از آمینواسیدهای غیر معمول^۳ (۸۸ عدد پپتید)، پپتیدهای دارای پیوند دی سولفیدی^۴ (۳۹۰ عدد پپتید) و پپتیدهای با ساختار نامعلوم^۵ (۱۴۱۲ عدد پپتید) استخراج شدند. بر اساس فعالیت نیز شش گروه شامل گروه‌های ضد باکتری (۲۰۹۳ عدد پپتید)، ضد قارچ

1. Alpha Helical AMPs
2. Beta sheets
3. Rich in unusual amino acids AMPs
4. Disulphide Bonds AMPs
5. Unknown 3D structure AMPs

۹۳۴ عدد پپتید)، ضد ویروس (۱۵۸ عدد پپتید)، ضد ویروس ایدز HIV (۹۴ عدد پپتید)، ضد سلول‌های پستانداران (۳۰۶ عدد پپتید) و ضد سرطان (۱۸۰ عدد پپتید) استخراج شدند.

مطالعه و بررسی خصوصیات بیوفیزیکی پپتیدهای ضد میکروبی

آنالیز بار پپتیدهای ضد میکروبی

در پایگاه داده APD، پپتیدها را می‌توان براساس بازه‌های مختلف بار (<0)، (0)، (>0)، (<-10)، (1 الی 4)، (2 الی 4)، ($3-4$)، ($5-10$)، (0 الی $5-$)، (1 الی 5)، (6 الی 10)، (11 الی 20) و (>20) می‌توان جستجو کرد. برای بررسی پراکندگی بار در این پپتیدها، بر مبنای چهار بازه ($1-5$ الی $5-$)، (0)، (1 الی 5)، (6 الی 10) پپتیدهای هر مجموعه داده (چه گروه‌های ساختاری و چه فعالیتی) دسته‌بندی و استخراج شدند.

آنالیز هیدروفوبیسیته پپتیدهای ضد میکروبی

در پایگاه داده APD، هیدروفوبیسیته‌ی پپتیدهای ضد میکروبی براساس مقیاس کیت-دولیتل^۱ محاسبه شده است. مقیاس کیت-دولیتل هیدروفوبیسیته‌ی آمینواسیدها را در بازه مقدراری ($4,5-$ الی $4,5+$) تعیین می‌کند و کمترین هیدروفوبیسیته (هیدروفیل‌ترین آمینواسید) که همان مقدار $4,5-$ است را به آمینواسید آرژینین و بیشترین هیدروفوبیسیته (هیدروفوب‌ترین آمینواسید) که همان مقدار $4,5+$ است را به آمینواسید ایزولوسین اختصاص می‌دهد [$101, 100$]. همانند بار، بازه‌های مختلفی ($10\% = <$)، (11% الی 20%)، (21% الی 30%)، (31% الی 40%)، (41% الی 50%)، (51% الی 60%)، (61% الی 70%)، (71% الی 80%)، (81% الی 90%)، ($90\% = >$) برای جستجوی پپتیدها در این پایگاه داده وجود دارد. براساس این بازه‌ها، گروه‌های مختلف ساختاری و فعالیتی پپتیدهای ضد میکروبی دسته‌بندی و استخراج شدند.

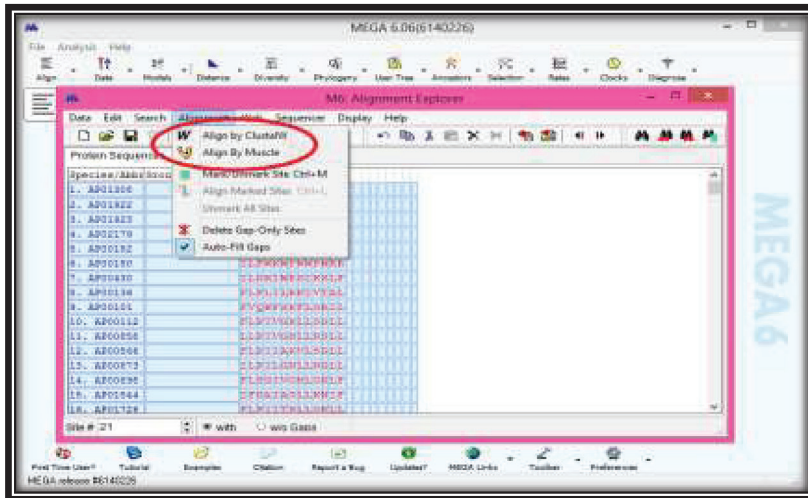
آنالیز طول پپتیدهای ضد میکروبی

علاوه بر بار و هیدروفوبیسیته، در این پایگاه داده می‌توان پپتیدهای ضد میکروبی را برحسب بازه‌های مختلف طولی ($2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15$ to $30, 11$ to $11, 15$ to $20, 21$ to $21, 30$ to $31, 40$ to $41, 50$ to $51, 60$ to $61, 70$ to $71, 80$ to $81, 90$ to $91, 30$ to 101) جستجو کرد. به دلیل فراوانی بیشتر پپتیدها در بازه‌های (11 الی 20)، (21 الی 30)، (31 الی 40)، (41 الی 50)، (51 الی 60)، از این بازه‌ها برای دسته‌بندی و استخراج پپتیدهای موجود در مجموعه داده‌ها استفاده شد.

1. Kyte Doolittle Scale

هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی

هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی به منظور دستیابی به آمینواسیدهای حفاظت شده در مجموعه داده‌های مختلفی که برای آن‌ها تنظیم شده، انجام شد. برای این منظور از نرم‌افزار تحت ویندوز مگا نسخه ۶٫۰ (MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis) استفاده شد (شکل ۲-۵) [۱۰۲]. این نرم‌افزار خود شامل دو برنامه هم‌ترازی تحت عناوین ClustalW و Muscle است. هر دو این برنامه‌ها هم‌ترازی جفتی^۱ و هم‌ترازی چندگانه^۲ انجام می‌دهند و تفاوت آن‌ها در الگوریتمی است که بدین منظور به کار می‌گیرند. از هر دو برنامه برای هم‌ترازی پپتیدها استفاده شد و نتایج بدست آمده با هم مقایسه شد.



شکل ۲-۲- تصویری از نرم‌افزار مگا به همراه دو برنامه‌ی هم‌ترازی موجود در آن.

ساخت فایل ورودی نرم‌افزار MEGA:

فایل ورودی این نرم‌افزار باید به فرمت FASTA باشد. (FASTA) فرمت مرسوم برای مطالعات فیلوژنی، انواع هم‌ترازی‌ها و دیگر مطالعات بیوانفورماتیکی است. در این فرمت، در یک سطر علامت (<) به همراه نام یا کد پپتید یا درشت مولکول مورد نظر و در سطر بعدی توالی آن نوشته می‌شود و همین‌طور ادامه می‌یابد. در اغلب سراسره‌ها و پایگاه‌های داده بیوانفورماتیکی می‌توان توالی مولکول (های) مورد نظر را در فایل‌ی به این فرمت دریافت کرد. اما متأسفانه پایگاه داده APD

-
1. Pairwise alignment
 2. Multiple alignment

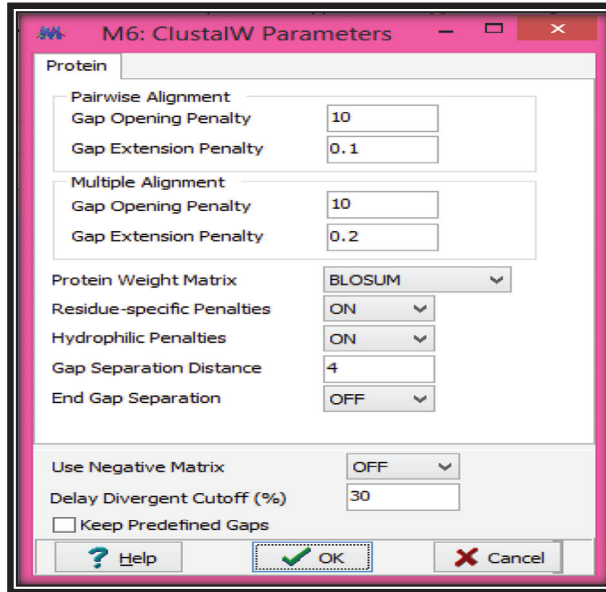
این طور نیست. به همین دلیل بعد از استخراج پپتیدها از این پایگاه داده، تمامی فایل های لازم برای مطالعه به صورت دستی به فرمت FASTA تبدیل شد.

هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی براساس ساختار سه بعدی

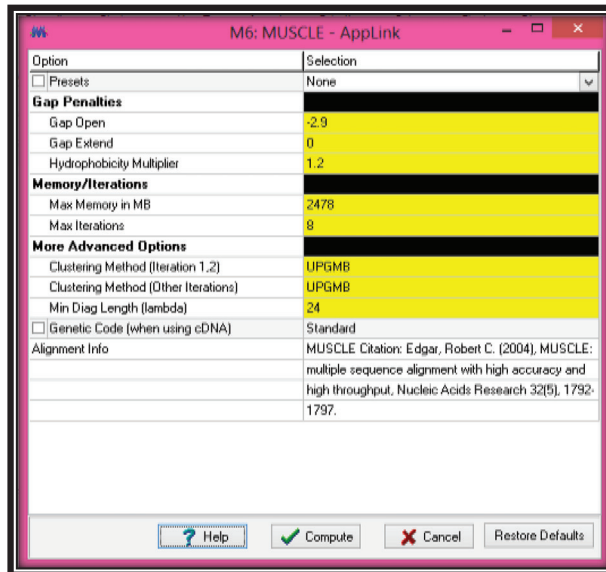
همان طور که قبلاً ذکر شد، براساس ساختار سه بعدی، پنج مجموعه داده از پایگاه داده APD استخراج شد (مارپیچ آلفا، صفحات بتا، پپتیدهای سرشار از آمینواسیدهای غیر معمول، پپتیدهای دارای پیوند دی سولفیدی و پپتیدهای با ساختار نامعلوم). با توجه به اینکه در هر مجموعه داده تعداد زیادی پپتید با طول های متفاوت وجود داشت، برای تجزیه و تحلیل بهتر، پپتیدهای هر مجموعه داده در بازه های ۱۰ تایی برحسب طول (۱ تا ۱۰، ۱۱ تا ۲۰، ۲۱ تا ۳۰ و...) آمینواسیدی) دسته بندی شدند. در مرحله ی اول، هر دسته به طور جداگانه در قالب FASTA نگارش و برای هم ترازی اولیه (یک مرتبه با برنامه ClustalW و یک مرتبه با MUSCLE) به نرم افزار مگا داده شد. در این مرحله نتیجه به صورت درخت فیلوژنی دریافت شد تا مشخص شود توالی کدام پپتیدها بیشتر به هم شباهت دارند. در مرحله دوم پپتیدهای موجود در هر خوشه ی درخت ها به صورت فایل FASTA تنظیم و به نرم افزار داده شد و مجدد با هر دو برنامه هم ترازی انجام شد.

هم ترازی پپتیدهای ضد میکروبی براساس فعالیت

لازم به یادآوری است که براساس فعالیت، شش مجموعه داده از پایگاه داده APD دانلود شد (ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، ضد ویروس HIV، ضد سلول های پستانداران، ضد سرطان). در این بخش کار نیز همانند مجموعه داده های برحسب ساختار سه بعدی، با توجه به اینکه در هر مجموعه داده تعداد زیادی پپتید با طول های متفاوت وجود داشت، برای تجزیه و تحلیل بهتر، پپتیدهای هر مجموعه داده در بازه های ۱۰ تایی برحسب طول (۱ تا ۱۰، ۱۱ تا ۲۰، ۲۱ تا ۳۰ و...) آمینواسیدی) دسته بندی شدند. در مرحله ی اول، هر دسته به طور جداگانه در قالب FASTA نگارش و برای هم ترازی اولیه (یک مرتبه با برنامه ClustalW (شکل ۲-۶) و یک مرتبه با MUSCLE (شکل ۲-۷) به نرم افزار مگا داده شد. در این مرحله نتیجه به صورت درخت فیلوژنی دریافت شد تا مشخص شود توالی کدام پپتیدها بیشتر به هم شباهت دارند. در مرحله دوم پپتیدهای موجود در هر خوشه ی درخت ها به صورت فایل FASTA تنظیم و به نرم افزار داده شد و مجدد با هر دو برنامه هم ترازی انجام شد.



شکل ۲-۳- پارامترهای تنظیم شده برای هم ترازی با برنامه ClustalW در نرم افزار مگا.



شکل ۲-۴- پارامترهای تنظیم شده برای هم ترازی با برنامه MUSCLE در نرم افزار مگا.

مطالعه‌ی بیوانفورماتیک پتیدهای ضد میکروبی

هدف از مطالعات انجام شده در این بخش، بررسی تأثیر خصوصیات بیوفیزیکی از جمله بار، هیدروفوبیسیت، طول و توالی آمینواسیدی پتیدها بر شکل‌گیری ساختار سه‌بعدی و نیز عملکردهای گوناگون آن‌ها می‌باشد.

خصوصیات بیوفیزیکی پتیدهای ضد میکروبی

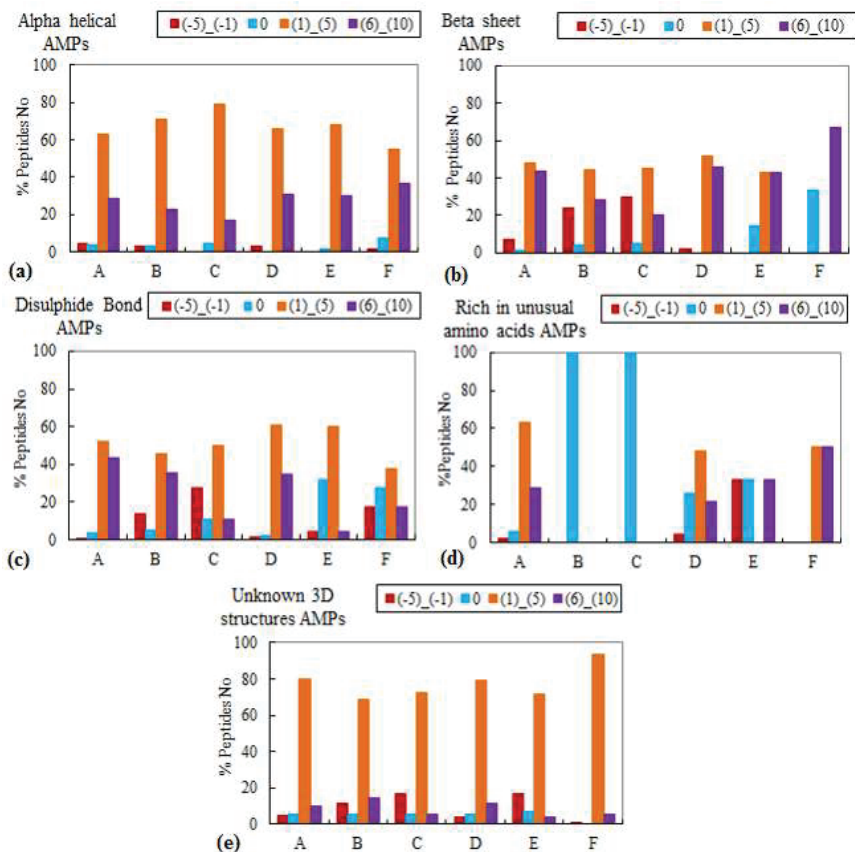
به منظور سهولت مطالعه، پتیدهای موجود در مجموعه داده‌های (Datasets) مختلف ساختاری و فعالیتی براساس فاکتورهای بیوفیزیکی ذکر شده به زیرگروه‌هایی دسته‌بندی شدند. سپس فراوانی آن‌ها در هر زیرگروه به دست آمد و نتایج حاصل به صورت نمودارهایی که در ادامه به توضیح آن‌ها خواهیم پرداخت گزارش شد.

نتایج حاصل از آنالیز بار پتیدهای ضد میکروبی

در ابتدا این آنالیز برای هر مجموعه داده‌های ساختاری (مارپیچ آلفا، صفحات بتا، پتیدهای دارای پیوند دی‌سولفیدی، پتیدهای سرشار از آمینواسیدهای نامعمول، پتیدهای با ساختار نامعلوم) به تفکیک بار و فعالیت گزارش شد. یعنی به عبارتی پتیدهای موجود در هر مجموعه داده‌ی ساختاری براساس فعالیت (ضدباکتری، ضدویروس، ضدویروس HIV، ضد قارچ، ضد سرطان، ضد سلول‌های یستانداران) گروه‌بندی شدند و سپس پتیدهای موجود در هر کدام از فعالیت‌ها نیز براساس بار تفکیک شدند. در این بخش از مطالعات، در پنج نمودار (شکل ۳-۱) پتیدهای موجود در تک‌به‌تک مجموعه داده‌ها برحسب ساختار سه‌بعدی مورد آنالیز بار قرار داده شده‌اند و تصویری از بار پتیدها با جزئیات بیشتر ارائه می‌دهند. در دو نمودار بعدی (شکل ۳-۲) تمام مجموعه داده‌ها (یکی برحسب ساختار سه‌بعدی و دیگری برحسب فعالیت) با هم مورد آنالیز بار قرار گرفته‌اند و تصویری کلی‌تر از بار پتیدها در اختیار قرار می‌دهند. با این نمودارها روی هم رفته می‌توان تعیین کرد که کدام محدوده‌ی باری برای شکل‌گیری ساختار و عملکرد پتیدهای ضد میکروبی قابل توجه‌تر و مؤثرتر است.

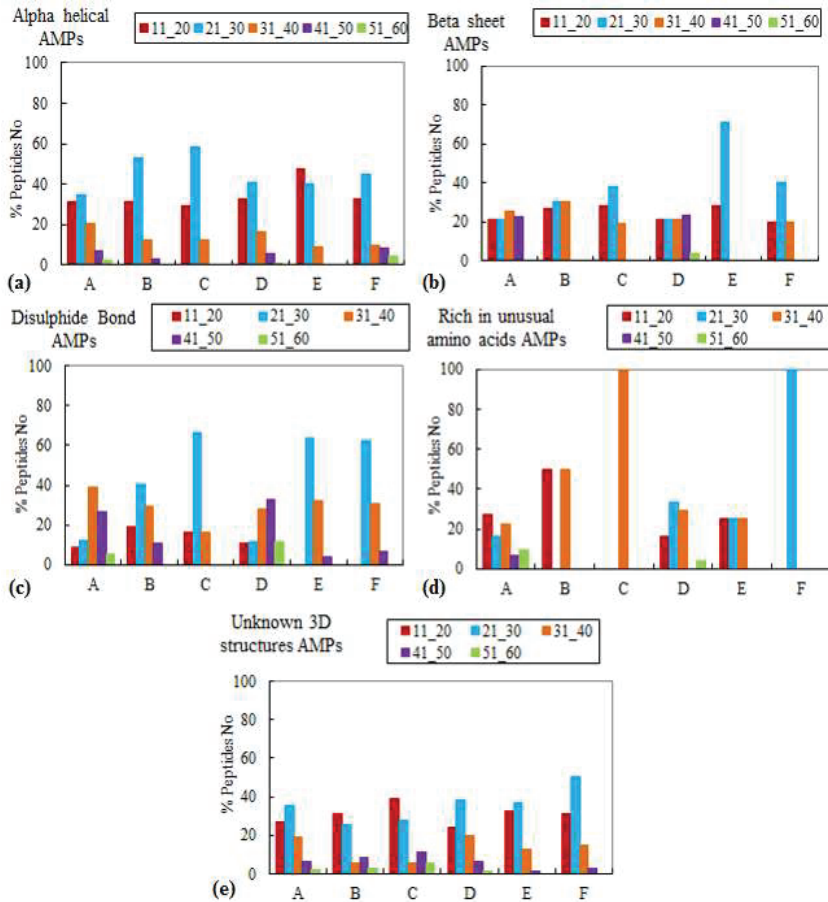
در ارتباط با پتیدهای با ساختار آلفا، بر طبق شکل (۳-۱a-)، تعداد پتیدهای دارای بار منفی و نیز بار صفر بسیار اندک هستند و بیشتر پتیدهای با ساختار مارپیچ آلفا دارای بار مثبت و کاتیونیک می‌باشند. در تمام گروه‌های فعالیتی این مجموعه داده نیز پتیدهایی که دارای بار مثبت ۱ الی ۵ هستند بسیار فراوان‌اند. بعد از آن تعداد پتیدهایی که دارای بار مثبت ۵ الی ۱۰ هستند فراوان‌اند. در کل آنچه آشکار است این است که بار مثبت در شکل‌گیری این ساختار (آمینواسیدهای دارای بار مثبت) و نیز فعالیت‌های متنوع آن مهم است اما تا حدی. به عبارتی بار بسیار مثبت هم چندان مطلوب نیست.

هستند. به طور کلی می‌توان گفت که بار مثبت مطلوب برای بیش از ۸۰٪ پپتیدهای موجود در این مجموعه داده در بازه‌ی (۱ الی ۵) است.



شکل ۳-۱- گروه‌های مختلف پپتیدهای ضد میکروبی برحسب ساختار. این نمودارها هر مجموعه داده‌ی ساختاری را به تفکیک فعالیت و بار نشان می‌دهند. A: ضد باکتری، B: ضد ویروس، C: ضد ویروس HIV، D: ضد قارچ، E: ضد سرطان، F: ضد سلول‌های پستانداران.

شکل (۳-۲-۳)، بار پپتیدهای ضد میکروبی را در مجموعه داده‌های ساختار سه بعدی بدون دسته بندی براساس فعالیت نشان می‌دهد. این نمودار نسبت به نمودارهای قبلی کلی تر است و آنچه بیان می‌کند این است که به طور کلی بیش از ۸۰٪ پپتیدهای ضد میکروبی با هر ساختاری که باشند بیشتر کاتیونیک هستند. اگر بخواهیم تک به تک برای ساختارهای سه بعدی بازه‌ی بار



شکل ۳-۵- گروه‌های مختلف پپتیدهای ضد میکروبی برحسب ساختار. این نمودارها هر مجموعه داده‌ی ساختاری را به تفکیک فعالیت و طول نشان می‌دهند. A: ضد باکتری، B: ضد ویروس، C: ضد ویروس، HIV، D: ضد قارچ، E: ضد سرطان، F: ضد سلول‌های پستانداران.

شکل (۳-۶) نیز یک تصویر کلی از طول توالی پپتیدهای ضد میکروبی در مجموعه داده‌های ساختار و فعالیتی ارائه می‌دهد. در این دو نمودار به وضوح می‌توان دریافت که بخش اعظم پپتیدهای ضد میکروبی در بازه‌ی ۱۱ الی ۴۰ آمینواسیدی قرار می‌گیرند. طول کوتاه‌تر یا بلندتر از این بازه برای آن‌ها چندان مطلوب نیست.

شکل ۳-۶- a) طول پپتیدهای ضد میکروبی در مجموعه داده‌های ساختار سه بعدی بدون تفکیک فعالیت. b) طول پپتیدهای ضد میکروبی در مجموعه داده‌های فعالیتی. A: ضد باکتری، B: ضد ویروس، C: ضد ویروس D، HIV: ضد قارچ، E: ضد سرطان، F: ضد سلول‌های پستانداران.

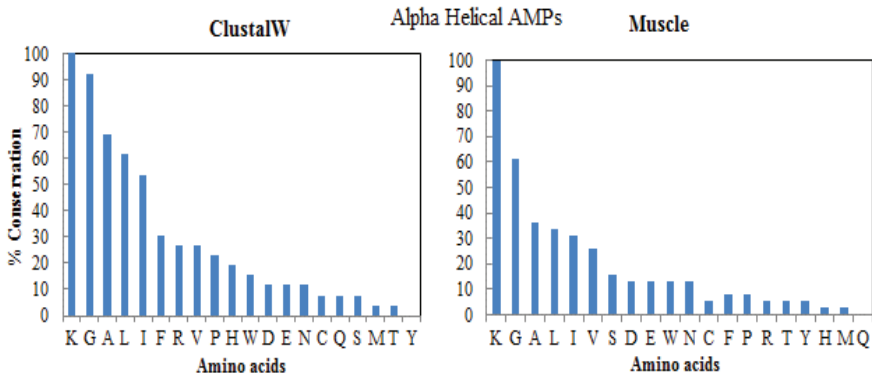
هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی

به منظور دستیابی به درصد حفاظت‌شدگی آمینواسیدها در توالی پپتیدهای ضد میکروبی و اینکه کدام یک از آن‌ها بیشتر در ساختار این پپتیدها حفاظت شده‌اند و نقش قابل توجهی دارند، پپتیدهای موجود در مجموعه داده‌های (Datasets) مختلف ساختاری و فعالیتی با هم هم‌تراز شدند. همان‌طور که در بخش روش‌ها اشاره شد این هم‌ترازی توسط دو برنامه (ClustalW و Muscle) موجود در نرم‌افزار Mega انجام شد. نتایج حاصل به صورت نمودارهایی که در ادامه به توضیح آن‌ها خواهیم پرداخت گزارش شد. لازم به ذکر است که نمودارها نسبت به آمینواسیدی که بیشترین حفاظت‌شدگی را داشته نرمالیزه شده‌اند.

نتایج حاصل از هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ساختار سه بعدی

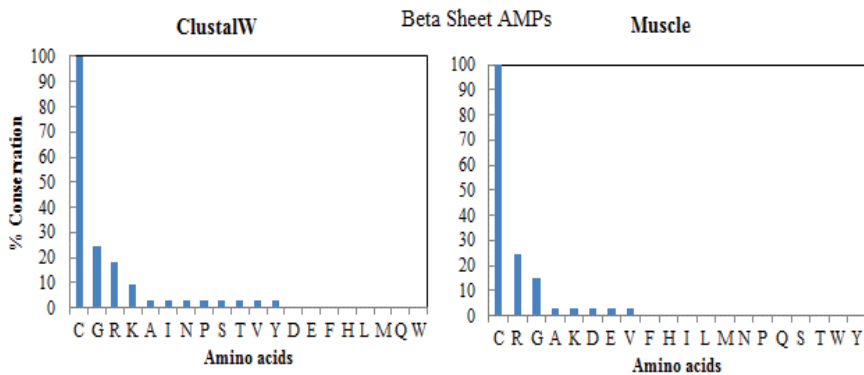
در این بخش مجموعه داده‌هایی که بر اساس ساختار سه بعدی دسته‌بندی شده بودند بر طبق روشی که در فصل دوم توضیح داده شد هم‌ترازی شدند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که برخی آمینواسیدهای حفاظت‌شده در بین مجموعه داده‌ها مشترک‌اند و در عین حال برخی نیز منحصر به یک مجموعه داده می‌باشند.

در نمودار (۳-۷) نتایج حاصل از هم‌ترازی پپتیدهای با ساختار مارپیچ آلفا قابل مشاهده است. بر طبق این نمودار آمینواسید لایزین (K)، گلیسین (G)، آلانین (A)، لوسین (L) و ایزولوسین (I) بیشترین حفاظت‌شدگی را در بین آمینواسیدها در توالی پپتیدهای با ساختار مارپیچ آلفا دارند. همان‌طور که مشاهده می‌شود این نتایج در بین هر دو برنامه ClustalW و Muscle مشترک هستند. بقیه نتایج کمی متفاوت‌اند ولی در کل هر دو برنامه نشان می‌دهند که بقیه آمینواسیدها در این مجموعه داده چندان حفاظت‌شده نیستند. نکته‌ای که در این نمودار قابل توجه است این است که آمینواسید سیستئین که با تشکیل پیوند دی سولفیدی سبب پایداری ساختار پپتیدها و پروتئین‌ها می‌شوند در اینجا حفاظت‌شده نیست. این نشان می‌دهد که این وجود آمینواسید برای پایداری این نوع پپتیدها ضروری نیست. البته لازم به ذکر است که حفاظت‌شدگی آمینواسیدها به گونه‌ای است که باعث همگن شدن نمودار شده است. این نشان می‌دهد که ساختار این پپتیدها پایدار است. همچنین از این نمودار به طور واضح قابل برداشت است که آمینواسیدهای آروماتیک (تیروزین Y، تریپتوفان W، فنیل آلانین F) و همچنین متیونین در این نوع پپتیدها حفاظت‌شده نیستند و در شکل‌گیری و پایداری ساختار آن‌ها نقش چندانی ندارند.



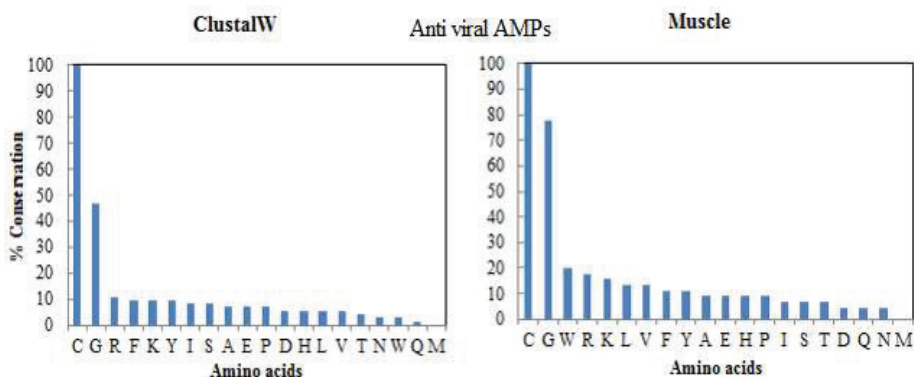
شکل ۳-۷- هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی با ساختار مارپیچ آلفا.

در نمودار (۳-۸) نتایج هم‌ترازی پپتیدهای با ساختار بتا گزارش شده است. در این نمودار کاملاً مشخص است که آمینواسیدها به‌غیر از سیستئین و کمی هم گلایسین و آرژینین حفاظت‌شدگی ندارند. یعنی به عبارتی نمودارها همگن نمی‌باشند که متوان این‌گونه برداشت کرد که ساختار پپتیدهای با ساختار بتا چندان پایدار و حفاظت‌شده نیستند. اما آنچه در اینجا قابل توجه است درصد حفاظت‌شدگی آمینواسید سیستئین است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد آمینواسید سیستئین با تشکیل پیوند دی‌سولفیدی سبب پایداری ساختاری می‌شود. پس آنچه سبب پایداری ساختار پپتیدهای با ساختار مارپیچ آلفا می‌شود آمینواسیدهای سیستئین می‌باشند.

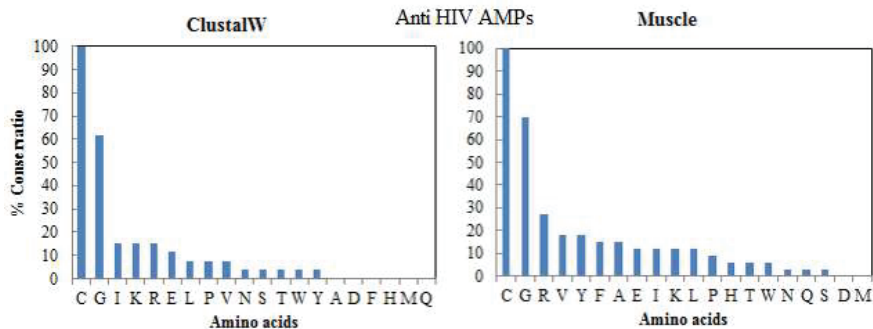


شکل ۳-۸- هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی با ساختار صفحات بتا.

در ارتباط با پپتیدهای ضد ویروسی (نمودار ۳-۱۲ و ۳-۱۳)، هر دو برنامه به طور مشترک نشان می‌دهند که آمینواسید سیستئین (C) و بعد از آن گلایسین (G) بیشترین حفاظت شدگی را در توالی این پپتیدها دارد. اما آمینواسیدهای دیگر حفاظت شدگی قابل توجهی ندارند. نمودار نیز همگن نمی‌باشد.



شکل ۳-۱۲- هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت ضد ویروسی.



شکل ۳-۱۳- هم‌ترازی پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت ضد ویروس HIV

در توالی پپتیدهای ضد قارچ (نمودار ۳-۱۴)، هر دو برنامه هم‌ترازی نشان می‌دهند که سیستئین (C)، گلایسین (G)، لایزین (K)، آلانین (A) و لوسین (L) به ترتیب دارای بیشترین حفاظت شدگی هستند. در این مجموعه داده نیز آمینواسیدهای آروماتیک حفاظت شدگی قابل توجهی ندارند. تنها می‌توان گفت که فنیل آلانین کمی حفاظت شده است.

(موازی با غشا) و انتهاهای پپتید را به صورت عمودی نسبت به غشا تنظیم و سپس مختصات آن را به صورت یک فایل pdb ذخیره می‌نماییم. اکنون اطلاعات جعبه متناوب را باید مشابه غشا تنظیم کنیم. اطلاعات جعبه متناوب در Crystline فایل‌های pdb ذخیره است. بنابراین Crystline فایل pdb غشا را جایگزین Crystline فایل pdb پپتید که مختصات آن را نسبت به غشا تنظیم شده بود، می‌کنیم. به این ترتیب مختصات پپتیدها نسبت به غشا در موقعیت مناسب به دست می‌آیند. سپس با استفاده از دستور gmx solvate در نسخه ۵,۰,۴ گرومکس، مختصات‌های لپید و پپتید را با هم ترکیب می‌کنیم و به صورت یک فایل pdb ذخیره می‌نماییم. به منظور حصول اطمینان از درست ترکیب شدن پپتید و غشا، فایل pdb را با VMD باز و بررسی می‌کنیم. به این ترتیب سیستم آغازی برای شبیه‌سازی آماده شده است. یک فایل توپولوژی نیز برای سیستم تعریف می‌کنیم تا بتوانیم در ادامه مراحل دیگر را پیش ببریم. فایل توپولوژی که علاوه بر مشخصات پپتید، مشخصات غشا را نیز در برداشته باشد (جدول ۲-۱ در بخش ضمیمه). لازم به ذکر است که در شکل‌های (۲-۶) الی (۲-۱۳) تصویری از این دستگاه‌ها نشان داده شده است.

افزودن یون و خنثی‌سازی سیستم‌ها

با در نظرگیری مجموع بار پپتید-غشا (سیستم)، تعداد مناسبی از یون‌های سدیم و کلر به غلظت ۰,۱ جهت خنثی‌سازی به هریک از سیستم‌های تحت مطالعه اضافه شد (جدول ۲-۲ در بخش ضمیمه).

حداقل سازی انرژی سیستم‌ها

پیش از انجام شبیه‌سازی، خصوصاً در مواردی که در ساختار اولیه تغییراتی ایجاد شده باشد، ساختار مورد نظر باید از نظر انرژی بهینه شود و میان‌کنش‌ها و تماس‌های نامناسب برطرف شود تا از نظر انرژی به حالت نسبتاً پایداری برسد. در غیر این صورت، انرژی بالای سیستم سبب آشفستگی و به هم ریختن ساختار می‌شود. به عبارتی حداقل سازی انرژی فرایندی است که طی آن نقاط کمینه از نظر انرژی روی سطح انرژی پتانسیل سیستم از طریق تغییر مکان اتم‌ها و محاسبه‌ی انرژی جستجویی شود و به این ترتیب ساختار اولیه به یک ساختار پایدارتر تبدیل می‌شود. تنظیمات این مرحله در فایل پارامتری minim.mdp مشخص و ثبت شده است (جدول ۲-۳ در بخش ضمیمه).

1. Energy minimization

به تعادل رسانی سیستم‌ها:

برای به تعادل رساندن سیستم‌ها بسته به اینکه کدام متغیرها ثابت باشند می‌توان از شرایط مختلفی از جمله NVE (حجم و انرژی ثابت)، NVT (حجم و دمای ثابت)، NPT (فشار و دمای ثابت) استفاده نمود. سیستم شبیه‌سازی شده زمانی به تعادل می‌رسد که رفتار آن نسبت به زمان، پایداری قابل قبولی از نظر دما، حجم، فشار و چگالی نشان دهد. در اغلب شبیه‌سازی‌هایی که با نرم‌افزار گرومکس انجام می‌شود، برای به تعادل رسانی سیستم از شرایط NVT و NPT استفاده می‌شود. این شرایط همچنین به شرایط آزمایشگاهی نزدیک‌ترند.

هنگرد NVT

همان‌طور که قبلاً گفته شد، این هنگرد تحت عنوان هنگرد کانونی هم-دما-هم حجم شناخته می‌شود و به سیستمی ترمودینامیکی اشاره دارد که در آن دما ثابت (T)، حجم ثابت (V)، تعداد اتم‌های سیستم نیز ثابت (N) اطلاق می‌شود. عموماً برای کنترل حجم و دمای سیستم تحت شبیه‌سازی به کار گرفته می‌شود. الگوریتم مورد استفاده در این فاز تعادل سازی، الگوریتم جفت‌شدگی ضعیف برنارسن می‌باشد. این مرحله از فرایند شبیه‌سازی سیستم‌ها در بازه‌ی زمانی ۲۰۰ پیکوثانیه انجام شد. تنظیمات و اطلاعات لازم برای این فاز در فایل nvt.mdp مشخص و ثبت شده است (جدول ۲-۴ در بخش ضمیمه).

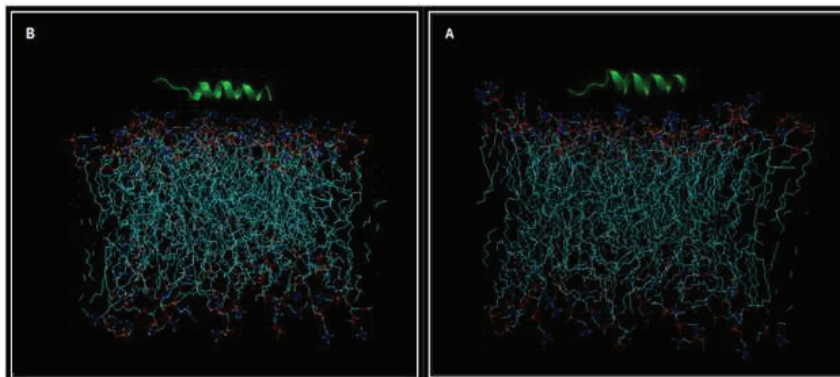
هنگرد NPT

این فاز از مرحله‌ی به تعادل رسانی نیز همان‌طور که قبلاً ذکر شد تحت عنوان هنگرد کانونی هم-دما-هم فشار شناخته می‌شود و به سیستمی ترمودینامیکی اشاره دارد که در آن دما ثابت (T)، فشار ثابت (P) و تعداد اتم‌های سیستم نیز ثابت در نظر گرفته می‌شود. این فاز نیز همچون فاز NVT از الگوریتم جفت‌شدگی ضعیف برنارسن برای شبیه‌سازی سیستم‌ها استفاده می‌کند. برای تمامی سیستم‌های اندرکنشی پپتید-غشا در این پایان‌نامه، این فاز در بازه‌ی زمانی ۵۰۰ پیکوثانیه انجام شد. تنظیمات و اطلاعات لازم برای این فاز نیز در فایل npt.mdp مشخص و ثبت شده است (جدول ۲-۵ در بخش ضمیمه).

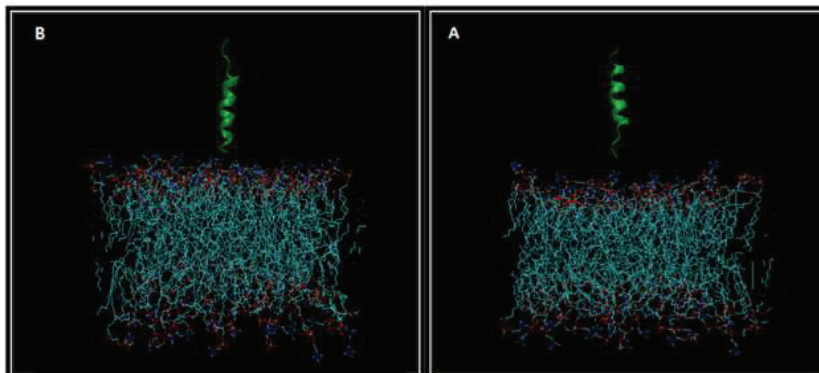
اجرای شبیه‌سازی نهایی سیستم‌ها (MD Run)

تا این مرحله سیستمی که در اختیار است، سیستمی است که از لحاظ انرژی بهینه شده، شرایط هم-دما-هم حجم و هم-دما-هم فشار روی آن اعمال شده است. بنابراین در این مرحله محدودیتی روی سیستم اعمال نمی‌شود و برنامه طی واحدهای زمانی معین (در اینجا ۲

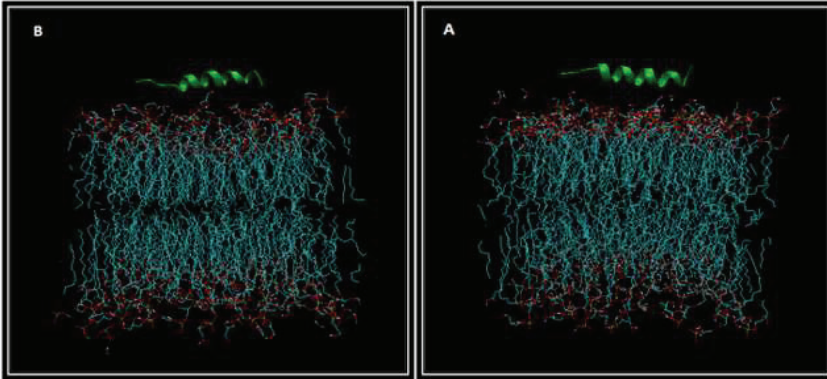
فمتوتائیه) مشخصات خروجی را جهت آنالیز گزارش می دهد. این مرحله نسبت به مراحل قبلی بسیار طولانی است. مدت زمانی که برای اجرای شبیه سازی سیستم های اندرکنشی پپتید-غشا در این پایان نامه در نظر گرفته شد ۵۰ نانوثانیه بود. تنظیمات و اطلاعات خاص این مرحله نیز در فایل md.mdp مشخص و ثبت شده است (جدول ۲-۶ در بخش ضمیمه).



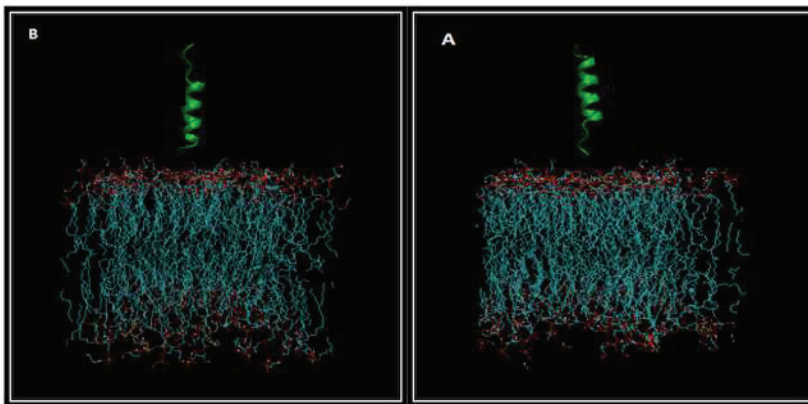
شکل ۲-۶ - سیستم آماده سازی شده ی پپتید فیلوسپتین H^۳ با غشای A. POPC. بخش هیدروفیل، B. بخش هیدروفوب.



شکل ۲-۷ - سیستم آماده سازی شده ی اندرکنشی پپتید فیلوسپتین H^۳ با غشای A. POPC. انتهای B، N، انتهای C.

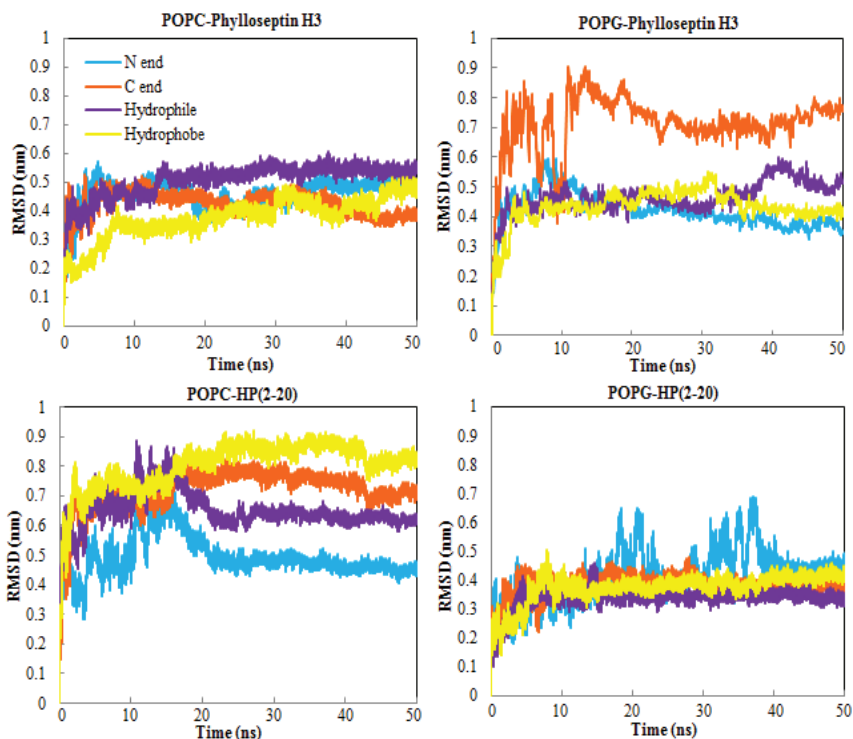


شکل ۲-۸- سیستم آماده‌سازی شده‌ی پپتید فیلوسپتین H^۳ با غشای آنیونی POPG. بخش هیدروفیل، B. بخش هیدروفوب



شکل ۲-۹- سیستم آماده‌سازی شده‌ی اندرکنشی پپتید فیلوسپتین H^۳ با غشای آنیونی POPG. انتهای N، B، C. انتهای

محدوده‌ی کوچکی از مقدار RMSD (بین ۰٫۳ الی ۰٫۴) نوسان و به تعادل رسیده است. ناحیه‌ی هیدروفیل پپتید نیز در همان زمان‌های ابتدایی شبیه‌سازی انحراف ساختاری داشته و RMSD آن به مقدار ۰٫۴۱ نانومتر رسیده و تا پایان زمان شبیه‌سازی در همین محدوده به تعادل رسیده است. انتهای C پپتید این پپتید هم در کمتر از ۱۰ نانوثانیه‌ی ابتدای شبیه‌سازی افزایش داشته و به مقدار ۰٫۴۷ نانومتر رسیده و سپس تا پایان شبیه‌سازی با کمی کاهش به تعادل رسیده است. انتهای N پپتید HP (۲-۲۰) در محدوده‌ی زمانی ۱۵ الی ۲۵ و ۳۰ الی ۴۰ نانوثانیه نوسانات مکرر داشته ولی از این زمان تا پایان شبیه‌سازی ۰٫۴ الی ۰٫۵ به تعادل رسیده است. در کل می‌توان گفت رفتار پپتید HP (۲-۲۰) با غشای آنیونی POPG نسبت به POPC بهتر بوده و در همان زمان‌های ابتدایی شبیه‌سازی سریع‌اً به تعادل رسیده است و نوسانات تعادلی کمتری داشته است. خصوصاً زمانی که از ناحیه‌ی هیدروفوب و هیدروفیل با این غشا در تماس است.



شکل ۳-۱۷- نمودار RMSD پپتید فیلوسپتین و HP (۲-۲۰) با غشای زویتریونیک POPC و غشای آنیونی POPG برحسب نانومتر در مقابل مدت زمان شبیه‌سازی.

جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF)

این پارامتر میزان نوسانات آمینواسیدهای موجود در توالی پپتیدها را در طول زمان شبیه سازی نشان می دهد. هر چه میزان نوسانات آمینواسیدی کمتر باشد، نشان دهنده ی این است که آن آمینواسید اتصال قوی تری با غشا دارد. به عبارت، دیگر هرچه نوسانات پپتید کمتر باشد پایدارتر است. در شکل (۳-۱۸) جذر میانگین مربع نوسانات چارچوب پپتیدهای ضد میکروبی فیلوسپتین و HP (۲-۲۰) با غشای زویتریونی POPC و آنیونی POPG در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی نشان داده شده است.

در سیستم های اندرکنشی پپتید فیلوسپتین با غشای POPC، میانگین RMSF برای زمانی که ناحیه ی هیدروفوب پپتید در تماس با غشاست برابر ۰٫۱۸ نانومتر، برای زمانی که ناحیه ی هیدروفیل پپتید در تماس با غشاست برابر ۰٫۱۵ نانومتر و برای انتهای N و انتهای C نیز به ترتیب برابر ۰٫۲ و ۰٫۱۳ نانومتر است.

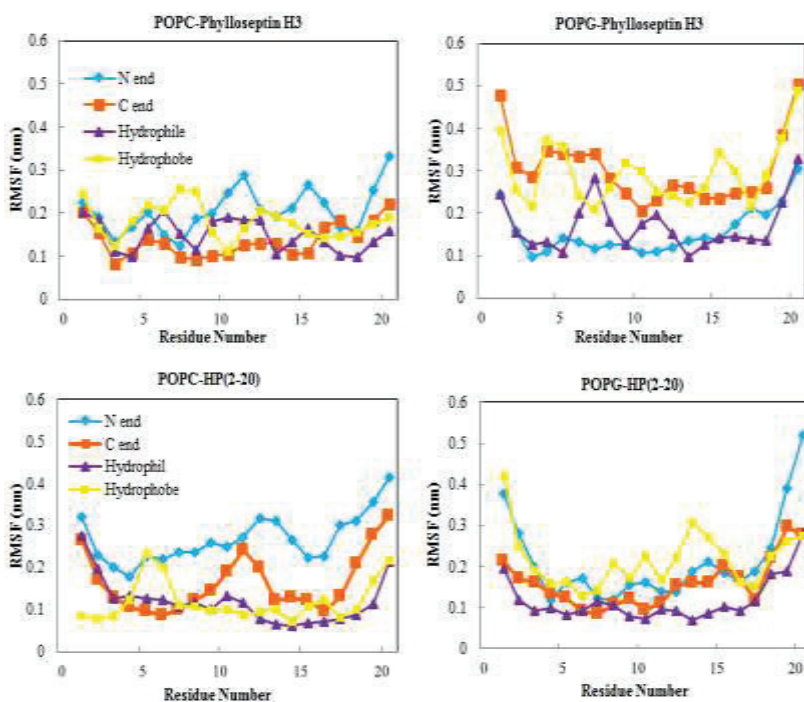
در شبیه سازی سیستم های اندرکنشی پپتید فیلوسپتین با غشای آنیونی POPG، میانگین RMSF برای ناحیه ی هیدروفوب و هیدروفیل پپتید، به ترتیب برابر ۰٫۳ و ۰٫۱۷ نانومتر است. همچنین برای انتهای N و انتهای C نیز به ترتیب برابر ۰٫۳ و ۰٫۱۵ نانومتر می باشد. آنچه به طور کلی می توان از نمودار RMSF این دودسته شبیه سازی برداشت کرد این است که ماریچ پپتید فیلوسپتین در حضور دولایه ی لیپیدی POPC پایدارتر از POPG است. به عبارتی نوسانات آمینواسیدهای داخلی و مرکزی ماریچ توسط غشای POPC نسبت به غشای POPG بیشتر مهار شده است. در سیستم های اندرکنشی پپتید با غشای POPG، آمینواسیدهای انتهایی نوسانات بیشتری دارند. یعنی انتهای این پپتید در حضور غشای POPG ناپایدارتر است. همچنین، در این سیستم ها هم مشخص است که انتهای N پپتید نسبت به انتهای C آن در اندرکنش با غشای آنیونی پایدارتر است. بنابراین، لازم به ذکر است که داده های بدست آمده از این روش آنالیزی نیز با داده های RMSD همخوانی دارند.

در ارتباط با سیستم های شبیه سازی اندرکنش پپتید HP (۲-۲۰) با غشای زویتریونیک POPC، داده های حاصل از RMSF نشان می دهند که میانگین نوسانات آمینواسیدی برای ناحیه هیدروفوب، هیدروفیل، انتهای N و انتهای C پپتید در تماس با غشا، به ترتیب برابر ۰٫۱۲، ۰٫۱۱، ۰٫۱۶ و ۰٫۲۶ نانومتر است.

داده های RMSF برای سیستم های اندرکنش پپتید HP (۲-۲۰) با غشای آنیونی POPG نیز نشان می دهند که میانگین نوسانات برای زمانی که ناحیه ی هیدروفوب و هیدروفیل پپتید در تماس با

این غشاست به ترتیب برابر ۰,۲۲، ۰,۱۲ نانومتر، و برای انتهای N و انتهای C برابر ۰,۲۱ و ۰,۲ نانومتر است.

با یک نگاه کلی به این نمودارها نیز می‌توان دریافت که مارپیچ پپتید HP (۲-۲۰) با غشای POPG نسبت به غشای POPC پایدارتر است. تنها آمینواسیدهای انتهایی در اندرکنش با غشای POPG ناپایدارترند. اما بخش‌های مرکزی پپتیدها پایدار است. همچنین انتهای N این پپتید نیز نسبت به انتهای C پایداری بیشتری را نشان می‌دهد. نوسانات پپتیدهای موجود در نواحی داخلی مارپیچ توسط این نوع غشا مهار شده است. بنابراین، به طور کلی می‌توان گفت که داده‌های حاصل از آنالیز RMSF برای این پپتید نیز تقریباً با نتایج RMSD همخوانی دارند.



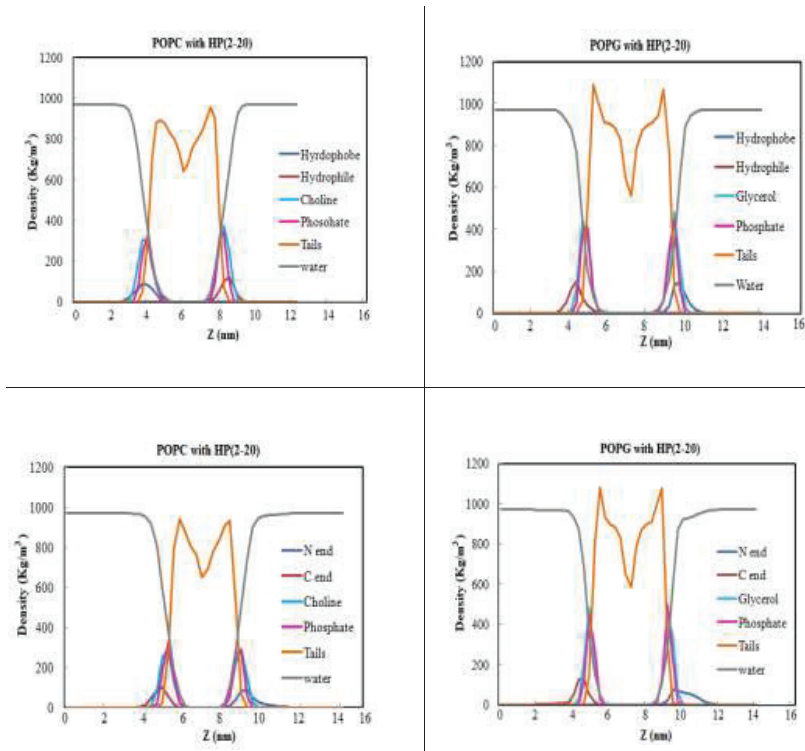
شکل ۳-۱۸- نمودار RMSF پپتید فیلوسپتین و HP (۲-۲۰) با غشای زویتریونیک POPC و غشای آنیونی POPG بر حسب نانومتر در مقابل مدت زمان شبیه‌سازی.

جهت‌گیری و موقعیت پپتیدها

چگالی

به منظور بررسی موقعیت و جهت‌گیری اجزای مختلف موجود در سیستم (پپتیدها، گروه‌های کولین، فسفات و گلیسرول سرفسفولیپیدها، بخش دم فسفولیپیدهای غشایی)، از پارامتر چگالی استفاده می‌شود.

نمودارهای مربوط به این پارامتر برای پپتید فیلوسپتین (شکل ۳-۱۹) نشان می‌دهد دولاپه‌ی لیپیدی برای تمام سیستم‌ها پایدار است و هیچ گروه سریا مولکول آبی در بخش هیدروفوب غشا مشاهده نمی‌شود. گروه‌های سرهمان‌طور که انتظار می‌رفت در بین مولکول‌های آب و گروه‌های دم فسفولیپیدی قرار دارند. آنچه در اینجا بیشتر مطرح است موقعیت پپتیدها نسبت به غشا می‌باشد. پپتید فیلوسپتین از هر جهتی که در تماس با غشا قرار گرفته (چه از ناحیه‌ی هیدروفوب، چه هیدروفیل، انتهای N یا C) نسبت به غشای POPC تمایل بیشتری داشته و بهتر وارد آن شده است. جهت‌گیری پپتید می‌توان گفت فقط به میزان اندکی در عمق ورود پپتید به این غشا تأثیر داشته است. زیرا همان‌طور که در نمودار قابل مشاهده است، عمق ورود پپتید به غشای POPC از انتهای N و ناحیه‌ی هیدروفوب نسبت به دو جهت‌گیری دیگر بیشتر است. در نمودارهای اندرکنش این پپتید با غشای POPG، می‌توان مشاهده کرد که در این سیستم‌ها نیز صرف‌نظر از ناحیه‌ای که پپتیدها با غشا در تماس بوده‌اند، به سمت فاز آبی متمایل شده‌اند. در رابطه با پپتید HP (۲-۲۰)، نمودارها (شکل ۳-۲۰) نشان می‌دهند که بخشه‌ای هیدروفوب و هیدروفیل پپتید با کمی تفاوت نسبت به حالت‌های انتهایی با عمق بیشتری وارد غشاها خصوصاً غشای POPG شده‌اند. بنابراین، به‌طور کلی، می‌توان گفت که جهت‌گیری پپتیدها تأثیر چندانی بر میزان ورودشان به غشا نداشته است، بلکه بیشتر ترکیب غشا بر میزان تمایل پپتید و ورود آن به غشا تأثیرگذارتر بوده است.



شکل ۳-۲۰- نمودار چگالی اجزای مختلف سیستم‌های شبیه‌سازی پپتید HP(۲-۲۰) با غشای زویتریونیک POPC و غشای آنیونی POPG برحسب نانومتر در مقابل مدت زمان شبیه‌سازی.

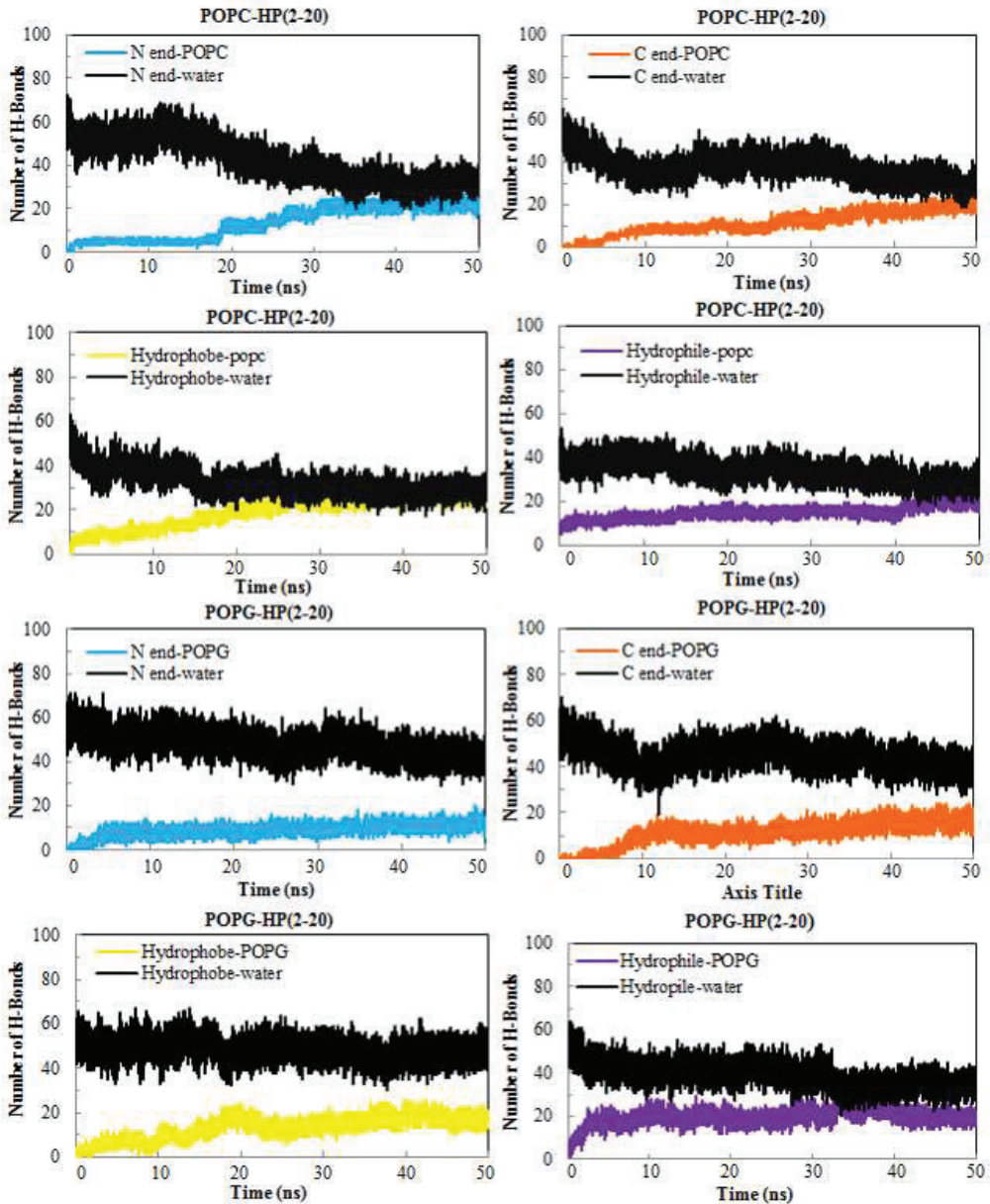
پیوند هیدروژنی

یکی از مهم‌ترین آنالیزها در بررسی موقعیت مکانی و جایگیری غشایی پپتیدهای ضد میکروبی، آنالیز تعداد پیوند هیدروژنی است. اگرچه این نوع پیوند نسبت به پیوند کووالانسی ضعیف می‌باشد، اما از نیروهای بین مولکولی قوی محسوب می‌شود و هرچه تعداد آن زیاد باشد نشان‌دهنده‌ی این است که دو مولکول نسبت به یکدیگر تمایل بیشتری داشته و به صورت محکم به هم متصل شده‌اند. در بررسی اندرکنش پپتید ضد میکروبی-غشا، هرچه تعداد پیوند هیدروژنی بین آب و پپتید در طول مدت شبیه‌سازی کاهش یابد و در عوض تعداد پیوند هیدروژنی بین پپتید-غشا افزایش یابد، نشان‌دهنده‌ی این است که پپتید به غشا تمایل داشته و به طور قوی‌تری به غشا متصل و وارد آن شده است.

تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید-آب و پپتید-غشا در طول مدت شبیه‌سازی برای هر سیستم محاسبه و با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. این آنالیزها برای پپتید فیلوسپتین با غشای POPC و POPG در شکل (۳-۲۱) نشان داده شده است. مطابق آنچه در این شکل است، زمانی که پپتید از انتهای N با غشا در تماس است، از همان زمان‌های ابتدایی شبیه‌سازی روند کاهش پیوند هیدروژنی بین پپتید و آب آغاز می‌شود و از ۳۸ نانوثانیه به بعد به یک مقدار نسبتاً ثابتی می‌رسد. روند افزایشی تشکیل پیوند هیدروژنی بین پپتید و لیپید نیز از همان ابتدای شبیه‌سازی آغاز شده و در ۲۵ نانوثانیه به بعد به مقدار نسبتاً ثابتی رسیده است. روند تشکیل پیوند هیدروژنی بین پپتید و غشای POPC زمانی که از انتهای C در تماس با غشا قرار می‌گیرد نیز از همان ثانیه‌های ابتدایی شبیه‌سازی آغاز شده و تقریباً از ۱۵ نانوثانیه به بعد به یک مقدار ثابتی رسیده است. روند کاهشی تعداد پیوندهای هیدروژنی در زمانی که پپتید به صورت افقی (چه هیدروفوب و چه هیدروفیل) با غشای POPC در تماس است نسبتاً کند می‌باشد در حالی که روند تشکیل پیوند هیدروژنی بین پپتید-غشا در این سیستم‌ها (خصوصاً برای حالت هیدروفوب) از همان آغاز شبیه‌سازی حالت افزایشی داشته است.

در سیستم‌های فیلوسپتین-POPG، همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، روند تشکیل پیوند هیدروژنی بین پپتید-غشا در حالتی که پپتید به صورت عمود (انتهای N و انتهای C) در تماس با غشا است و همچنین روند کاهش پیوند بین پپتید-مولکولهای آب نسبتاً کند است. خصوصاً در زمانی که پپتید از انتهای C با غشا تماس دارد بسیار مشهود است که تا زمان ۱۴ نانوثانیه هیچ پیوند هیدروژنی بین پپتید و غشا تشکیل نشده است. روند تشکیل پیوند هیدروژنی زمانی که پپتید به حالت افقی با غشای POPG در تماس است از همان ابتدای شبیه‌سازی مطلوب به نظر می‌رسد. ولی در هیچ‌کدام از این سیستم‌ها، نمودار کاهش پیوند هیدروژنی بین پپتید-آب و تشکیل پیوند بین پپتید-غشا تداخلی با یکدیگر ندارند. در نهایت می‌توان گفت که داده‌های ای آنالیز نیز نشان می‌دهند که پپتید فیلوسپتین تمایل بیشتری به غشای POPC دارد و نسبت به POPG، به صورت مطلوب‌تری به POPC متصل شده و در آن جایگیری کرده است.

در مورد سیستم‌های HP(۲-۲۰)-POPC (شکل ۳-۲۲)، هنگامی که پپتید از انتهای N با غشا در تماس است، تقریباً ۱۵ نانوثانیه طول می‌کشد تا تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید-آب شروع به کاهش کند. در عوض از همان ابتدای شبیه‌سازی تشکیل پیوند هیدروژنی بین پپتید و غشا آغاز می‌شود و تا ۱۸ نانوثانیه ابتدایی شبیه‌سازی یک روند ثابتی دارد و سپس مجدد افزایش می‌یابد و به محدوده‌ی ۲۰ تا ۳۰ پیوند هیدروژنی می‌رسد. ولی بعد از آن تا انتهای مدت زمان شبیه‌سازی ثابت باقی می‌ماند. در سیستم اندرکنش انتهای C پپتید-غشای POPC، تا زمان ۱۰ نانوثانیه پیوند



شکل ۳-۲۲- تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید-آب و پپتید-لیپید در سیستم های شبیه سازی پپتید HP(۲-۲۰) با غشای POPC و POG در مدت زمان شبیه سازی

تابع توزیع شعاعی (RDF)

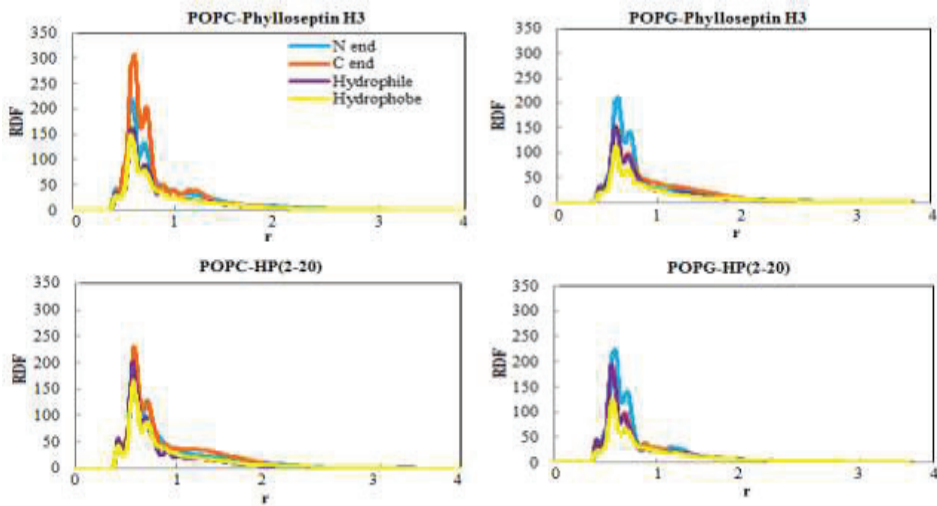
همان‌طور که از عنوان این پارامتر مشخص است، تراکم ذرات B را در اطراف ذره A مشخص می‌کند. در این روش آنالیزی، در واقع دو پارامتر فاصله و شدت مطرح هستند. فاصله در محور X و شدت در محور Y بیان می‌شود. به عبارتی شدت ذرات B را در فواصل شعاعی اطراف ذرات A را نشان می‌دهد. بنابراین برای بیان و ارزیابی قدرت اتصال دو مولکول به یکدیگر مناسب است. یعنی هرچه پیک بیشتر باشد و فاصله (شعاع) کمتر باشد (نمودار به سمت چپ متمایل‌تر باشد)، قدرت اتصال دو مولکول بیشتر است.

تابع توزیع شعاعی در مورد سیستم‌های اندرکنش پپتید فیلوسپتین با غشای زویتریونی POPC (شکل ۳-۲۳)، نشان می‌دهد که فاصله برای هر چهار سیستم پپتید-غشا (چه ناحیه‌ی هیدروفوب، چه هیدروفیل یا انتهای N و یا انتهای C) ثابت است، اما شدت نمودارها متفاوت می‌باشد. شدت نمودار برای پپتیدی که از انتهای C در تماس با غشا بوده بیشتر است. بعد از آن به ترتیب انتهای N، ناحیه‌ی هیدروفیل و سپس ناحیه‌ی هیدروفوب اتصال بهتری دارند. ناحیه‌ی هیدروفوب گرچه کمترین شدت را دارد اما نسبت به بقیه شعاع کمتری دارد. برای سیستم‌های اندرکنش این پپتید با غشای آنیونی POPG، نیز هم ترتیب پپتیدها و هم شدت آن‌ها نسبت به سیستم‌های پپتید-POPC متفاوت است. در این سیستم‌ها، بیشترین شدت RDF مربوط به زمانی است که انتهای N پپتید در اندرکنش با غشای POPG است. بعد از آن انتهای N و ناحیه‌ی هیدروفیل تقریباً در یک سطح قرار دارند (اما شعاع حالت هیدروفیل کمی کمتر از حالت انتهای N است) و سپس کمترین مقدار برای ناحیه‌ی هیدروفوب است. این پارامتر نیز نشان می‌دهد که اندرکنش پپتید فیلوسپتین با غشای POPC نسبت به غشای POPG بهتر و شدیدتر است. زیرا نمودارهای مربوط به آن‌ها نسبت به نمودارهای مربوط به سیستم‌های فیلوسپتین-POPG هم شدت بیشتری دارند و هم فاصله (شعاع) آن‌ها کمتر است و به عبارتی نمودارها به سمت چپ متمایل‌ترند.

آنالیز RDF برای سیستم‌های اندرکنش پپتید ضد میکروبی HP(۲-۲۰)-POPC (شکل ۳-۲۳) نشان می‌دهند که پپتید به ترتیب از انتهای C، ناحیه هیدروفیل و انتهای N تقریباً در یک سطح و سپس ناحیه‌ی هیدروفوب اتصال بهتری با این غشا برقرار کرده‌اند.

همچنین برای سیستم‌های اندرکنش HP(۲-۲۰)-POPG، به ترتیب انتهای N، انتهای C و ناحیه‌ی هیدروفیل تقریباً در یک سطح و سپس ناحیه‌ی هیدروفوب اتصال بهتری با غشا برقرار کرده‌اند. در رابطه با اندرکنش این پپتید با غشای POPC و POPG باید به این نکته نیز اشاره کرد

که درست است که تقریباً شدت نمودارهای RDF برای هر دو غشا یکسان است، اما نمودارهای مربوط به اندرکنش پپتید با غشای POPG نسبت نمودارها مربوط به اندرکنش این پپتید با غشا POPC، تمایلشان به سمت چپ (شعاع کمتر) کمی بیشتر است.



شکل ۳-۲۳- نمودار RDF پپتید فیلوسپتین و HP(۲-۲۰) با غشای زویتریونیک POPC و غشای آنیونی POPG برحسب نانومتر در مقابل مدت زمان شبیه سازی.

تغییرات ساختار دوم پپتیدها در طول شبیه سازی (DSSP)

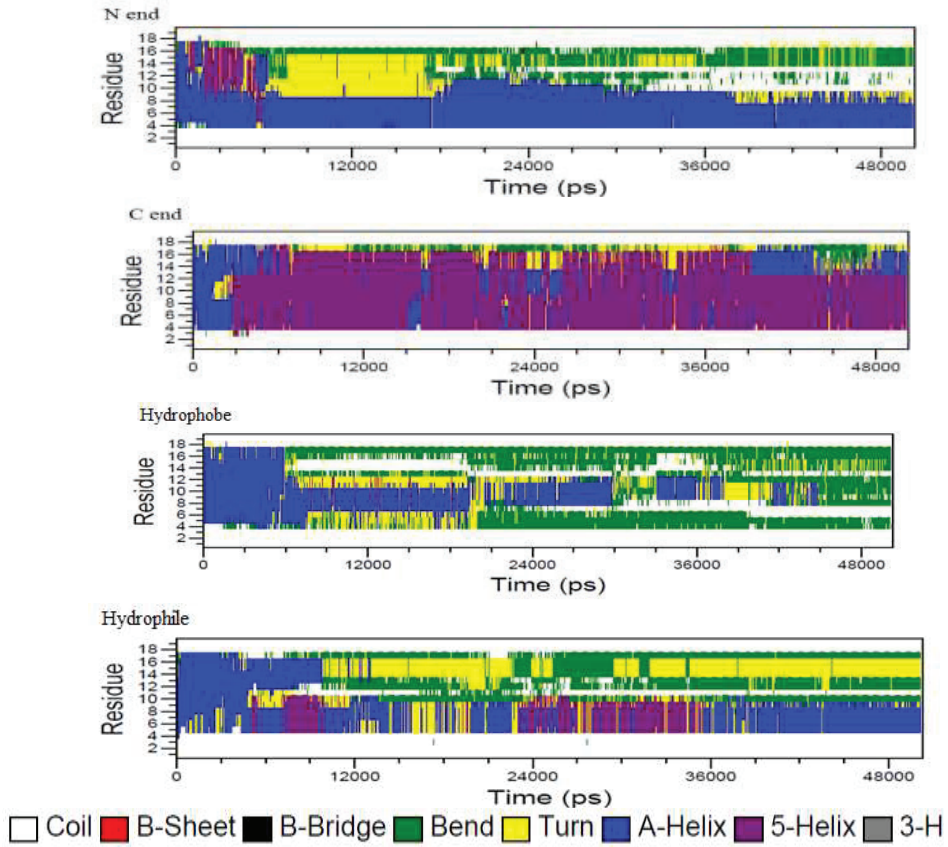
این پارامتر تغییرات ساختار دوم پپتیدها و تبدیل آن به دیگر ساختارهای دوم در اثر اندرکنش با لیپیدها یا هر مولکول زیستی دیگر را نشان می دهد. در اندرکنش پپتید فیلوسپتین با غشای POPC (شکل ۳-۲۴) این آنالیز نشان می دهد که ساختار پپتید از هر جهتی وارد اندرکنش شود به هم ریخته و از حالت مارپیچ آلفا خارج می شود. اما نحوه ی تغییرات ساختاری متفاوت است. زمانی که پپتید از انتهای N در تماس با غشا قرار گرفته از آمینواسید شماره ی ۴ الی ۹ تقریباً تا انتهای شبیه سازی ساختار مارپیچی را حفظ کرده اند. اما بقیه توالی پپتید پایدار نبوده و به حالت های Turn، Bend و α -Helix و Coil تبدیل شده است. در حالتی که پپتید از انتهای C در تماس با غشا غیر از ۳۰۰۰ پیکوانیسه ی ابتدایی شبیه سازی، ساختار آن کاملاً تغییر کرده و به صورت α -Helix درآمده است. هنگامی که پپتید به صورت افقی در تماس با غشای POPC

قرارگرفته (چه هیدروفیل و چه هیدروفوب)، تقریباً تا ۶۰۰۰ پیکوتانیه‌ی ابتدایی شبیه‌سازی ساختار مارپیچ آلفای آن حفظ شده ولی بعد از این مدت ساختارش کاملاً به صورت Turn، Bend، Coil و Helix-۵ تبدیل شده است.

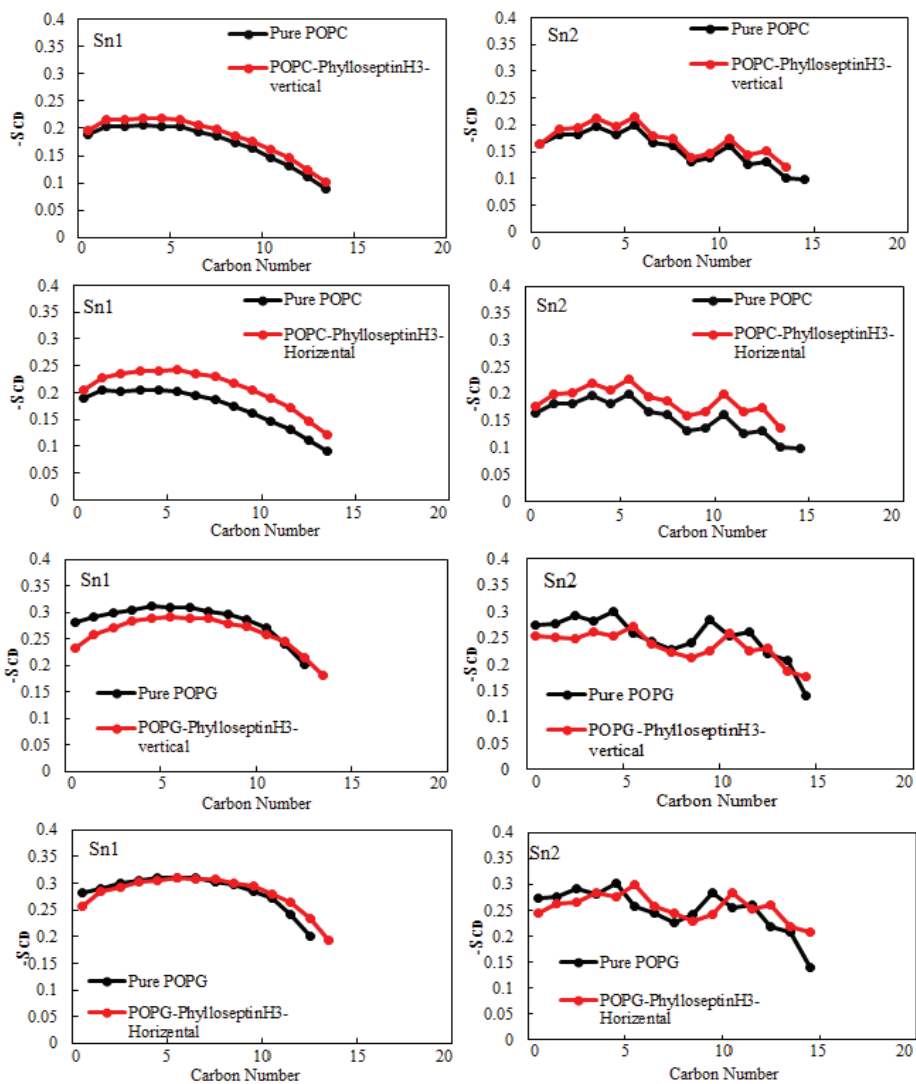
در اندرکنش با غشا POPG (شکل ۳-۲۵) نیز پپتید از هر جهتی که در اندرکنش با غشا قرار گرفته، ساختار خود را از دست داده ولی زمانی که از ناحیه‌ی هیدروفیل در تماس با غشای POPG قرار می‌گیرد، آمینواسیدهای ۹ الی ۱۲ تغییرات ساختاری بسیار کمتری را در طول شبیه‌سازی نشان می‌دهند. ولی از ناحیه‌ی هیدروفوب که با غشا در تماس قرار می‌گیرد به شدت ساختار خود را از دست داده است.

پپتید HP (۲-۲۰) در اندرکنش با غشای POPC (شکل ۳-۲۶)، از انتهای N و C تقریباً به‌طور کامل ساختار خود را از دست می‌دهد. اما در حالت افقی هنگامی که از ناحیه‌ی هیدروفیل در تماس با غشاست، از آمینواسید ۱۰ الی ۱۸ ساختار مارپیچی‌اش حفظ شده است، و از ناحیه‌ی هیدروفوب نیز از آمینواسید ۹ الی ۱۷ تا ۱۸ نانوتانیه‌ی ابتدایی شبیه‌سازی ساختارش حفظ شده است. تغییرات ساختار دوم به ساختارهای دیگر نیز در این پپتید برحسب جهتی که با غشا در تماس قرار می‌گیرد، متفاوت است.

در اندرکنش این پپتید با غشای آنیونی POPG، باید به این نکته اشاره کرد که ساختار پپتید نسب به اندرکنش با غشای POPC حفظ شده است. خصوصاً هنگامی که از ناحیه‌ی هیدروفیل و انتهای C در تماس با غشا قرار می‌گیرد. از ناحیه‌ی هیدروفیل، توالی آمینواسیدی ۶ الی ۱۵ تا انتهای شبیه‌سازی حفظ شده است. از انتهای C نیز توالی آمینواسیدی ۷ الی ۱۳ تقریباً تا انتهای شبیه‌سازی ساختار مارپیچی خود را حفظ کرده است. در این سیستم‌های شبیه‌سازی، هنگامی که پپتید از ناحیه‌ی هیدروفوب در تماس با غشاست، بیشترین تخریب ساختار را دارد. این نتایج نشان می‌دهند پپتیدها از هر ناحیه‌ای وارد غشا شود دچار تغییر ساختاری خواهد شد اما مقدار و نوع آن و همچنین توالی آمینواسیدی که دچار تغییر ساختاری می‌شود متفاوت است.



شکل ۳-۲۴ - پروفایل ساختار دوم پپتید فیلوسپتین در اندرکنش با غشای POPC از ناحیه‌ی هیدروفوب، هیدروفیل، انتهای N، انتهای C.



شکل ۳-۲۹- نظم زنجیره‌های هیدروکربنی در سیستم‌های لیپیدی خالص و در حضور فیلوسپتین

پژوهش‌های انجام شده در این پایان‌نامه در راستای تأثیر خصوصیات بیوفیزیکی مختلف (بار، هیدروفوبیسیته و طول) و همچنین ترکیب توالی آمینواسیدی بر پایداری ساختاری و عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشد. بخش اول پژوهش‌ها شامل مطالعات بیوانفورماتیکی مختلف بود که در راستای تأیید نتایج حاصل از آن‌ها، و نیز تأثیر ترکیب غشای سلولی هدف بر عملکرد پپتیدها، مطالعات دینامیک مولکولی نیز انجام شد.

درآمدی بر کتاب

مطالعات بیوانفورماتیکی

این مطالعات نشان دادند که بخش اعظم پپتیدهای ضد میکروبی دارای بار مثبت هستند و کاتیونیک می‌باشند. اما بازه‌ی باری مطلوب برای پایداری ساختاری و عملکردی آن‌ها بین +۱ الی +۵ می‌باشد. همچنین هیدروفوبیسیته‌ی مطلوب برای آن‌ها نیز در محدوده‌ی ۳۰٪ الی ۶۰٪ است. به عبارتی ساختار آن‌ها آمفی‌پاتیک است و این آمفی‌پاتیکی برای دامنه‌ی عملکردی و نیز پایداری ساختاری آن‌ها ضروری است. بررسی و مطالعه‌ی طول این پپتیدها نشان داد که دارای طول و تعداد آمینواسیدهای متنوع هستند، اما هرچه طول آن‌ها کوتاه‌تر باشد بازده عملکردی بهتری خواهند داشت. اما کوتاهی طول نیز محدوده‌ای داد و باید در حدی باشد که پپتیدها بتوانند به صورت ساختار سه‌بعدی مطلوب (مارپیچ آلفا، بتا، ترکیبی از این دو ساختار، دور، حلقه و...) تا بخورند. بنابراین می‌توان گفت محدوده و رنج طولی مناسب برای آن‌ها که بتوانند هم ساختار مناسب داشته باشند و هم کیفیت فعالیت‌های مختلف آن‌ها بهینه باشد، باید طولی بین ۱۵ الی ۴۰ آمینواسید داشته باشند.

این نتایج بدست آمده با نتایج مطالعات و پژوهش‌های آزمایشگاهی انجام شده مطابقت دارند. مطالعات انجام شده در راستای بررسی رابطه‌ی بین ساختار و عملکرد پپتیدها نشان داده که بار مثبت و ساختار آمفی‌پاتیک برای عملکرد آن‌ها بسیار مهم و تأثیرگذار است. اندرکنش پپتیدهای ضد میکروبی با غشای سلول‌ها طی سه مرحله صورت می‌گیرد. در مرحله‌ی اول تشکیل پیوندهای الکتروستاتیکی بین پپتیدهای با بار مثبت و غشای منفی سلول‌های باکتری است. در مرحله‌ی دوم پپتید جذب غشا شده و در مرحله‌ی آخر علاوه بر اینکه پپتید ساختار خود را از دست می‌دهد، سبب تغییر در ساختار و نظم زنجیره‌های هیدروکربنی غشا شده و به این ترتیب سلول را از بین می‌برد. بنابراین برای انجام این فرایند بار پپتید بسیار مهم است. به عبارتی تا پپتید با غشا وارد اندرکنش الکتروستاتیک نشود نمی‌تواند جذب غشا شده و سبب اختلال در ساختار آن شود [۱۱۱]. بار مثبت پپتیدها تمایل آن‌ها را به لایه‌ی لیپوپلی ساکارید سطح سلول‌های باکتری افزایش

می دهد و به این ترتیب سبب بهینه شدن فعالیت پپتید می شود. البته گزارشات دیگر نیز حاکی از آن است افزایش بار پپتیدها تا حدی می تواند سبب بهینه شدن فعالیت آن ها شود، به عبارتی بار بسیار مثبت هم تأثیر چندانی بر بهینه سازی فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی ندارد [۷] که نتایج حاصل از پژوهش های انجام شده در این پایان نامه نیز این مطلب را تأیید می کنند. البته لازم به ذکر است که در پژوهش های مختلف رنج باری مختلفی برای عملکرد بهینه ی پپتیدها گزارش شده است، برای مثال در یک مطالعه ای به تأثیر بار بر عملکرد ضدباکتری آنالوگ های پپتید مگانین پرداخته شده است گزارش شده که افزایش بار پپتید به $+6$ و $+7$ سبب فعالیت همولیتیک و نامطلوب پپتید می شود [۱۱۲]، در عوض در مطالعه ی دیگری گزارش شده که فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی با افزایش بار آن ها تا $+9$ به صورت تدریجی افزایش می یابد [۱۱۳]. در این خصوص باید گفت که غیر از بار خصوصیات دیگر بیوفیزیکی و ساختاری و همچنین نوع غشایی که پپتید با آن در اندرکنش است نیز در شدت فعالیت آن تأثیرگذار است و نمی توان عملکرد آن ها را تنها به یک عامل نسبت داد. همچنان که نتایج حاصل از پژوهش های این پایان نامه نیز این موضوع را تأیید می کند. در رابطه با تأثیر هیدروفوبیسیته، بررسی های انجام شده نشان می دهند که هیدروفوبیسیته خصوصیت مهمی در میزان رسوخ پپتید به درون غشاست اما افزایش بیش از حد آن به منظور فعالیت بهینه ی پپتیدها هم می تواند تأثیر عکس بر فعالیت آن ها داشته باشد هم اینکه سبب افزایش سمیت پپتید برای سلول های پستانداران می شود [۱۱۴]. پس می توان گفت مطلوب بودن عامل هیدروفوبیسیته نیز همانند بار محدوده ای دارد [۱۱۵]، افزایش آن در برخی مواقع می تواند مفید باشد و در برخی مواقع نامطلوب. به عبارتی این خصوصیت نیز به تنهایی نمی تواند برای شدت عملکرد و فعالیت پپتیدها تعیین کننده باشد. بسته به عوامل و شرایط دیگر ممکن است هیدروفیل بودن، هیدروفوب یا آمفی پاتیک بودن پپتید مطلوب باشد. نتایج این پایان نامه نیز نشان می دهد که تعداد پپتیدهایی که به شدت هیدروفوب یا به شدت هیدروفیل باشند بسیار اندک است و هیدروفوبیسیته ی بخش اعظم آن ها بیشتر در محدوده 30% الی 60% است. بنابراین پپتیدها برای عملکرد بهینه و پایداری ساختاری نیازمند درصد هیدروفوبیسیته متوسط هستند که تعیین درصد دقیق برای هر پپتید به دیگر خصوصیات بیوفیزیکی آن مرتبط است. در ارتباط با تأثیر طول نیز همان طور که از نتایج بدست آمده پیداست و پژوهش های انجام شده ی دیگر، باید گفت که طول آمینواسیدی بسیار بلند برای عملکرد پپتیدها مطلوب نیست و مانند دیگر خصوصیات بیوفیزیکی بررسی شده، افزایش این عامل نیز تا حدی باعث بهبود فعالیت پپتیدها می شود که در این مورد بررسی های مختلفی انجام و گزارش شده است [۱۱۶، ۱۱۷].

بیشتری وارد این غشا شده است. گزارشات حاکی از آن است که بین آنالوگ‌های پپتید HP (۲-۲۰)، پپتیدی که دارای درصد هیدروفوبیسیته‌ی بیشتری است فعالیت ضد میکروبی مطلوب‌تری هم دارد. و در مورد خود پپتید، با اینکه درصد هیدروفوبیسیته‌ی پایینی دارد، اما به دلیل داشتن بار مثبت بالا، اندرکنش بهتری با غشای آنیونی می‌دهد [۱۳۱, ۱۳۲]. در اینجا هم نتایج بدست آمده تأیید کننده این مطلب می‌باشند.

همچنین نتیجه‌ی دیگری که می‌توان از آنالیزهای این بخش گرفت این است که، با اینکه جهت‌گیری ابتدایی ورود پپتیدها تأثیر چندانی در ورود آن‌ها به داخل غشا ندارد، اما تأثیر به سزایی بر تغییرات ساختار دوم پپتیدها بعد از ورود به غشا می‌گذارد. به عبارت دیگر، هنگامی که پپتید از انتهای N یا C و یا حتی از جهت هیدروفیل یا هیدروفوب در تماس با غشا قرار گیرد، تغییرات ساختار دوم متفاوتی به دنبال خواهد داشت. می‌توان چنین نیز برداشت کرد که تغییراتی که در ساختار پپتیدها در داخل غشا بروز می‌کند، به نوع بار، نوع غشا، میزان هیدروفوبیسیته ارتباط چندانی ندارد، بلکه به جهتی که پپتید در اندرکنش با غشا قرار می‌گیرد، بستگی دارد.

تأثیر ورود پپتیدها به غشا بر ساختار غشا

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، فیلوسپتین پپتیدی هیدروفوب و HP (۲-۲۰) پپتیدی هیدروفیل است، در مورد غشای POPC، فیلوسپتین سبب افزایش نظم بیشتر زنجیره‌های هیدروکربنی نسبت به HP (۲-۲۰) شده است. به عبارت دیگر پپتیدی که هیدروفوب‌تر است با عمق بیشتری وارد غشا شده است. بنابراین می‌توان گفت هیدروفوبیسیته در اینجا سبب اندرکنش قوی‌تر پپتید شده است. در مطالعه‌ای که در رابطه با نحوه‌ی اندرکنش پپتیدهای کاتیونیک با هیدروفوبیسیته‌ی ۴۵٪ انجام شده، گزارش شده است که وقتی پپتید باعث افزایش نظم زنجیره‌های هیدروکربنی شود نشانه‌ی این است که لیپیدها پپتید جای‌گیری شده در غشا را احاطه کرده‌اند. همچنین، هنگامی که نظم زنجیره‌های هیدروکربنی لیپید در حضور پپتید کاهش می‌یابد نشانه‌ی این است که پپتید با سطح لیپید اندرکنش داده است [۱۰۹].

References

1. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research*, 2009. 37 (suppl 1): p. D933–D937.
2. Zanetti, M., Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of leukocyte biology*, 2004. 75(1): p. 39–48.
3. HULTMARK, D., et al., Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 1980. 106(1): p. 7–16.
4. Zasloff, M., Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987. 84(15): p. 5449–5453.
5. Patterson–Delafield, J., et al., Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infection and immunity*, 1981. 31(2): p. 723–731.
6. Hancock, R.E., Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert opinion on investigational drugs*, 2000. 9(8): p. 1723–1729.
7. Matsuzaki, K., et al., Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram–negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*, 1997. 1327(1): p. 119–130.
8. Matsuzaki, K., Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self–defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*, 1999. 1462(1): p. 1–10.
9. Huang, Y., J. Huang, and Y. Chen, Alpha–helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*, 2010. 1(2): p. 143–152.
10. Castro, M.S. and W. Fontes, Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2005. 12(1): p. 11–16.
11. Montesinos, E., Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS microbiology*

- letters, 2007. 270(1): p. 1–11.
12. Lay, F. and M. Anderson, Defensins –components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science*, 2005. 6(1):p. 85–101.
13. García Olmedo, F., et al., Plant defence peptides. *Peptide Science*, 1998. 47(6): p. 479–491.
14. Broekaert, W.F., et al., Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997. 16(3): p. 297–323.
15. Majewski, J. and B. Stec, X–ray scattering studies of model lipid membrane interacting with puromycin provide support for a previously proposed mechanism of membrane lysis. *European Biophysics Journal*, 2010. 39(8): p. 1155–1165.
16. Stotz, H.U., J. Thomson, and Y. Wang, Plant defensins: defense, development and application. *Plant signaling & behavior*, 2009. 4(11): p. 1010–1012.
17. Hancock, R.E. and D.S. Chapple, Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1999. 43(6): p. 1317–1323.
18. Hoffmann, J.A., et al., Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999. 284(5418): p. 1313–1318.
19. Casteels, P., et al., Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal*, 1989. 8(8): p. 2387.
20. Bulet, P., et al., Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999. 23(4): p. 329–344.
21. Yi, H.-Y., et al., Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014. 98(13): p. 5807–5822.
22. Landon, C., et al., Solution structures of stomoxyn and spinigerin, two insect antimicrobial peptides with an α -helical conformation. *Biopolymers*, 2006. 81(2): p. 92–103.
23. Mandard, N., et al., Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two–dimensional nuclear magnetic resonance data. *European journal of biochemistry*, 1998. 256(2): p. 404–410.
24. Boman, H.G., Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of*

- immunology, 1995. 13(1): p. 61–92.
25. Ganz, T. and R.I. Lehrer, Antimicrobial peptides of leukocytes. Current opinion in hematology, 1997. 4(1): p. 53–58.
26. Ganz, T., Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Reviews Immunology, 2003. 3(9): p. 710–720.
27. Bowdish, D., D. Davidson, and R. Hancock, Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins, in Antimicrobial Peptides and Human Disease. 2006, Springer. p. 27–66.
28. White, S.H., W.C. Wimley, and M.E. Selsted, Structure, function, and membrane integration of defensins. Current opinion in structural biology, 1995. 5(4): p. 521–527.
29. Xie, C., et al., Reconstruction of the conserved β -bulge in mammalian defensins using D-amino acids. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(38): p. 32921–32929.
30. Epanand, R.M., The amphipathic helix. 1993: CRC Press.
31. Blondelle, S.E., et al., The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. Journal of applied bacteriology, 1995. 78(1): p. 39–46.
32. Ludtke, S.J., et al., Membrane pores induced by magainin. Biochemistry, 1996. 35(43): p. 13723–13728.
33. Tamamura, H., et al., A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr 5, 12, Lys 7]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Protein Structure and Molecular Enzymology, 1993. 1163(2): p. 209–216.
34. Epanand, R.M. and H.J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes, 1999. 1462(1): p. 11–28.
35. Fahrner, R.L., et al., Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. Chemistry & biology, 1996. 3(7): p. 543–550.
36. Khandelia, H. and Y.N. Kaznessis, Structure of the antimicrobial β -hairpin peptide protegrin-1 in a DLPC lipid bilayer investigated by molecular dynamics simulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes, 2007. 1768(3): p. 509–520.
37. Buffy, J.J., et al., Solid-state NMR investigation of the depth of insertion of protegrin-1

- in lipid bilayers using paramagnetic Mn²⁺. *Biophysical journal*, 2003. 85(4):p. 2363–2373.
38. Jang, H., et al., Interaction of protegrin-1 with lipid bilayers: membrane thinning effect. *Biophysical journal*, 2006. 91(8):p. 2848–2859.
39. Kim, I.W., et al., Effects of the synthetic coprisin analog peptide, CopA3 in pathogenic microorganisms and mammalian cancer cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2012. 22(1):p. 156–158.
40. Shin, A., et al., 9-Meric Peptide Analogs of Defensin-like Antimicrobial Peptide Coprisin with Potent Antibacterial Activities with Bacterial Cell Selectivities. *Bull. Korean Chem. Soc*, 2014. 35(9):p. 2809.
41. Lee, J., et al., Antimicrobial effects of coprisin on wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. *Wound Repair and Regeneration*, 2013. 21(6):p. 876–882.
42. Lee, E., et al., Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure–activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*, 2013. 1828(2):p. 271–283.
43. Kang, J.K., et al., The insect peptide coprisin prevents *Clostridium difficile*–mediated acute inflammation and mucosal damage through selective antimicrobial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011. 55(10):p. 4850–4857.
44. Selsted, M.E., et al., Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(7):p. 4292–4295.
45. Ladokhin, A.S., M.E. Selsted, and S.H. White, Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. *Biophysical journal*, 1997. 72(2 Pt 1):p. 794.
46. Friedrich, C.L., et al., Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *Journal of biological chemistry*, 2001. 276(26):p. 24015–24022.
47. Falla, T.J., D.N. Karunaratne, and R.E. Hancock, Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271(32):p. 19298–19303.
48. Hsu, C.-H., et al., Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial

- peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic acids research*, 2005. 33(13): p. 4053–4064.
49. Végh, A.G., et al., Effect of antimicrobial peptide–amide: indolicidin on biological membranes. *BioMed Research International*, 2011. 2011.
50. Ehrenstein, G. and H. Lecar, Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics*, 1977. 10(01): p. 1–34.
51. Reddy, K., R. Yedery, and C. Aranha, Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 2004. 24(6): p. 536–547.
52. Brogden, K.A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 2005. 3(3): p. 238–250.
53. Yang, L., et al., Barrel–stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal*, 2001. 81(3): p. 1475–1485.
54. Matsuzaki, K., et al., Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*, 1998. 37(34): p. 11856–11863.
55. Giuliani, A., G. Pirri, and S. Nicoletto, Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2007. 2(1): p. 1–33.
56. Tossi, A., L. Sandri, and A. Giangaspero, Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 2000. 55(1): p. 4–30.
57. Harris, M., et al., Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology*, 2009. 155(4): p. 1058–1070.
58. John, H., et al., N-terminal acetylation protects glucagon–like peptide GLP–1–(7–34)–amide from DPP–IV–mediated degradation retaining cAMP–and insulin–releasing capacity. *European journal of medical research*, 2008. 13(2): p. 73.
59. Bader, D.A., Computational biology and high–performance computing. *Communications of the ACM*, 2004. 47(11): p. 34–41.
60. Xiong, J., *Essential bioinformatics*. 2006: Cambridge University Press.
61. Heerman, D., *Computer simulation methods in theoretical physics*. *Applied Optics*,

1987. 26: p. 1818.

62. Wereszczynski, J. and J.A. McCammon, Statistical mechanics and molecular dynamics in evaluating thermodynamic properties of biomolecular recognition. Quarterly reviews of biophysics, 2012. 45(01): p. 1–25.

63. McCammon, J.A., Theory of biomolecular recognition. Current opinion in structural biology, 1998. 8(2): p. 245–249.

64. Stone, M.J., NMR relaxation studies of the role of conformational entropy in protein stability and ligand binding. Accounts of chemical research, 2001. 34(5): p. 379–388.

65. Olsson, T.S., et al., The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design. Journal of molecular biology, 2008. 384(4): p. 1002–1017.

66. Chandler, D., Introduction to modern statistical mechanics. Introduction to Modern Statistical Mechanics, by David Chandler, pp. 288. Foreword by David Chandler. Oxford University Press, Sep 1987. ISBN–10: 0195042778. ISBN–13: 9780195042771, 1987. 1.

67. There, A.C., THE ERGODIC–HYPOTHESIS.

68. Cunha, A.R., Understanding the ergodic hypothesis via analogies. Physicae, 2013. 10(10): p. 9.

69. Pathria, R. and P. Beale, Statistical Mechanics. Butterworth. 2009, Heinemann. Elsevier.

70. Nosé, S., A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. Molecular physics, 1984. 52(2): p. 255–268.

71. Laurendeau, N.M., Statistical thermodynamics: fundamentals and applications. 2005: Cambridge University Press.

72. Evans, D.J. and G. Morriss, The isothermal/isobaric molecular dynamics ensemble. Physics Letters A, 1983. 98(8): p. 433–436.

73. Guvench, O. and A.D. MacKerell Jr, Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations, in Molecular modeling of proteins. 2008, Springer. p. 63–88.

74. Monticelli, L. and D.P. Tieleman, Force fields for classical molecular dynamics, in Biomolecular Simulations. 2013, Springer. p. 197–213.

75. Levitt, M., et al., Potential energy function and parameters for simulations of the molec–

- ular dynamics of proteins and nucleic acids in solution. *Computer physics communications*, 1995. 91(1):p. 215–231.
76. Ponder, J.W. and D.A. Case, Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*, 2003. 66: p. 27–85.
77. Langham, A. and Y.N. Kaznessis, Molecular simulations of antimicrobial peptides, in *Antimicrobial Peptides*. 2010, Springer. p. 267–285.
78. Chen, C., et al., A comparison of united atom, explicit atom, and coarse-grained simulation models for poly (ethylene oxide). *The Journal of chemical physics*, 2006. 124(23):p. 234901.
79. Case, D.A., et al., Amber 11. 2010, University of California.
80. Jorgensen, W.L., OPLS force fields. *Encyclopedia of computational chemistry*, 1998.
81. Jorgensen, W.L., D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. 118(45): p. 11225–11236.
82. Paquet, E. and H.L. Viktor, *Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review*. *BioMed research international*, 2015. 2015.
83. Wu, X. and B.R. Brooks, Self-guided Langevin dynamics simulation method. *Chemical Physics Letters*, 2003. 381(3):p. 512–518.
84. Adcock, S.A. and J.A. McCammon, Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, 2006. 106(5): p. 1589–1615.
85. Kräutler, V., W.F. van Gunsteren, and P.H. Hünenberger, A fast SHAKE algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*, 2001. 22(5): p. 501–508.
86. Doyle, P.S. and P.T. Underhill, Brownian dynamics simulations of polymers and soft matter, in *Handbook of Materials Modeling*. 2005, Springer. p. 2619–2630.
87. Van Gunsteren, W. and H. Berendsen, Algorithms for Brownian dynamics. *Molecular Physics*, 1982. 45(3): p. 637–647.
88. Leach, A.R., *Molecular modelling: principles and applications*. 2001: Pearson education.

89. Kang, W., Molecular dynamics simulations and microscopic hydrodynamics of nanoscale liquid structures. 2008.
90. Allen, M.P., Introduction to molecular dynamics simulation. Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins, 2004. 23: p. 1–28.
91. Matyus, E., C. Kandt, and D.P. Tieleman, Computer simulation of antimicrobial peptides. Current medicinal chemistry, 2007. 14(26): p. 2789–2798.
92. Khandelia, H., Computer Simulations of Antimicrobial Peptides. 2006: ProQuest.
93. Case, D.A., et al., The Amber biomolecular simulation programs. Journal of computational chemistry, 2005. 26(16): p. 1668–1688.
94. Brooks, B.R., et al., CHARMM: the biomolecular simulation program. Journal of computational chemistry, 2009. 30(10): p. 1545–1614.
95. Phillips, J.C., et al., Scalable molecular dynamics with NAMD. Journal of computational chemistry, 2005. 26(16): p. 1781–1802.
96. Kalé, L., et al., NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. Journal of Computational Physics, 1999. 151(1): p. 283–312.
97. Van Der Spoel, D., et al., GROMACS: fast, flexible, and free. Journal of computational chemistry, 2005. 26(16): p. 1701–1718.
98. Wang, Z. and G. Wang, APD: the antimicrobial peptide database. Nucleic acids research, 2004. 32(suppl 1): p. D590–D592.
99. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic acids research, 2015: p. gkv1278.
100. Kyte, J. and R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of molecular biology, 1982. 157(1): p. 105–132.
101. Dekhne, A., A bioinformatics approach to increasing the solubility of protein-based drugs. 2014.
102. Tamura, K., et al., MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution, 2013. 30(12): p. 2725–2729.
103. Alder, B.J. and T. Wainwright, Studies in molecular dynamics. I. General method. The

- Journal of Chemical Physics, 1959. 31 (2):p. 459–466.
104. Becker, O.M. and M. Karplus, Guide to biomolecular simulations. Vol. 4. 2006: Springer Science & Business Media.
105. Abraham, M., et al., GROMACS development team (2014) GROMACS User manual version 5.0.4.
106. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics, 1996. 14(1): p. 33–38.
107. Hughes, Z.E., A.E. Mark, and R.L. Mancera, Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO with DPPC and DOPC phospholipid membranes. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. 116(39): p. 11911–11923.
108. Johansson, A.C. and E. Lindahl, The role of lipid composition for insertion and stabilization of amino acids in membranes. The Journal of chemical physics, 2009. 130(18): p. 185101.
109. Rahmanpour, A., et al., Interaction of Piscidin-1 with zwitterionic versus anionic membranes: A comparative molecular dynamics study. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2013. 31(12): p. 1393–1403.
110. Tieleman, D.P., S.-J. Marrink, and H.J. Berendsen, A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Reviews on Biomembranes, 1997. 1331(3): p. 235–270.
111. Seelig, J., Thermodynamics of lipid–peptide interactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes, 2004. 1666(1): p. 40–50.
112. Dathe, M., et al., Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. FEBS letters, 2001. 501(2): p. 146–150.
113. Zelezetsky, I. and A. Tossi, Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes, 2006. 1758(9): p. 1436–1449.
114. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological reviews, 2003. 55(1): p. 27–55.

115. Jiang, Z., et al., Effects of Hydrophobicity on the Antifungal Activity of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Chemical biology & drug design*, 2008. 72(6): p. 483–495.
116. Liu, Z., et al., Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. 51(2): p. 597–603.
117. Dong, N., et al., Strand length-dependent antimicrobial activity and membrane-active mechanism of arginine- and valine-rich β -hairpin-like antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012. 56(6): p. 2994–3003.
118. Dennison, S.R., et al., Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein and peptide letters*, 2005. 12(1): p. 31–39.
119. Xia, X. and Z. Xie, Protein structure, neighbor effect, and a new index of amino acid dissimilarities. *Molecular biology and evolution*, 2002. 19(1): p. 58–67.
120. White, S.H. and W.C. Wimley, Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 1999. 28(1): p. 319–365.
121. Yang, S.-T., et al., Conformation-dependent antibiotic activity of tritrypticin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. 296(5): p. 1044–1050.
122. Xia, X., The rate heterogeneity of nonsynonymous substitutions in mammalian mitochondrial genes. *Molecular Biology and Evolution*, 1998. 15(3): p. 336–344.
123. Powers, J.-P.S. and R.E. Hancock, The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 2003. 24(11): p. 1681–1691.
124. Raj, P.A. and A.R. Dentino, Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters*, 2002. 206(1): p. 9–18.
125. Hoskin, D.W. and A. Ramamoorthy, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*, 2008. 1778(2): p. 357–375.
126. Lata, S., B. Sharma, and G. Raghava, Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*, 2007. 8(1): p. 263.
127. Mishra, B. and G. Wang, The importance of amino acid composition in natural AMPs:

- an evolutionary, structural, and functional perspective. *Frontiers in immunology*, 2012. 3.
128. Masuda, M., et al., A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr 5, 12, Lys 7]-polyphemusin II). *Biochemical and biophysical research communications*, 1992. 189(2): p. 845–850.
129. Dobrzyńska, I., et al., Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 2005. 276(1–2): p. 113–119.
130. Burdick, M.D., et al., Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(39): p. 24198–24202.
131. Lee, K., et al., Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2–20) and its analogues derived from *Helicobacter pylori*. *Biochem. J*, 2006. 394: p. 105–114.
132. Apetrei, A., et al., Unimolecular study of the interaction between the outer membrane protein OmpF from *E. coli* and an analogue of the HP (2–20) antimicrobial peptide. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2010. 42(2): p. 173–180.

جدول ۶-۱- نمونه ای از فایل توپولوژی که هم محتوی مشخصات پپتید و هم غشا می باشد.

```

;      GROMACS:   gmx pdb2gmx, VERSION 5.0.4
;      Executable: /usr/local/gromacs/bin/gmx
;      Library dir: /usr/local/gromacs/share/gromacs/top
;      Command line:
;      pdb2gmx -f 1.pdb -o 1.gro -ignh -ter -water spc -missing
;      Force field was read from the standard Gromacs share
directory.
;
; Include forcefield parameters
#include "gromos54a7.ff/forcefield.itp"
#include "lipid.itp"
#include "popc.itp"

; Include chain topologies
#include "topol_Protein_chain_A.itp"
#include "topol_Protein_chain_X.itp"

; Include water topology
#include "gromos54a7.ff/spc.itp"
#ifdef POSRES_WATER
; Position restraint for each water oxygen
[ position_restraints ]
; i  funct   fcx   fcy   fcz
  1  1    1000   1000   1000
#endif
; Include topology for ions
#include "gromos54a7.ff/ions.itp"

[ system ]
; Name
Protein POPC

[ molecules ]
; Compound      #mols
Protein_chain_A  1
Protein_chain_X  1
POPC             126
SOL              13803
NA               ....
CL               ....

```


جدول ۶-۲- مشخصات فایل ions.mdp مربوط به مرحله افزودن یون و خنثی سازی سیستم

```

;ions.mdp

;Parameters describing what to do, when to stop and what to
save
integrator          = steep
emtol               = 1000
emstep             = 0.01
nsteps             = 50000

;Parameters describing how to find the neighbors of each atom
and how to calculate the interactions
nstlist            = 1
ns_type            = grid
rlist              = 0.1
coulombtype        = PME
rcoulomb           = 0.1
rvdw               = 0.1
pbc                = xyz
    
```

جدول ۶-۳- مشخصات فایل minim.mdp مورد نیاز برای مرحله کمینه سازی

```

;minim.mdp

;Parameters describing what to do, when to stop and what to
save
integrator          = steep
emtol               = 500,0
emstep             = 0.01
nsteps             = 500000
constraints         = none

;Parameters describing how to find the neighbors of each atom
and how to calculate the interactions
nstlist            = 5
ns_type            = grid
rlist              = 1.2
coulombtype        = PME
rcoulomb           = 1.2
rvdw               = 1.2
pbc                = xyz
optimize_fft       = yes
ewald_rtol         = 1e-5
pme_order          = 4
fourierspacing    = 0.12
cutoff-scheme     = verlet
vdw-type           = cut-off
    
```