مقـاله مروری

مقابله با مقاومت‌هـای میکروبی با بهره‌منـدی از پپتیدهای آنتی‌بیوتیکی تخلیص شـده ازقارچ‌هـا

احسان زمانی [۱]، جمیل زرگان [۲*]، اشکان حاجی نورمحمدی [۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی مولکولی، مرکز و گروه علوم زیستی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران

[۲] استادیار، مرکز علم و فن آوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران

[۳] کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، مرکز علم و فن آوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: مرکز علم و فن آوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران

نشانی الکترونیک: jazrgan@ihu.ac.ir

چکیده

در سال‌های اخیر مقاومت‌های میکروبی و مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای رایج به تهدیدی جدید برای درمان عوامل تهدید کننده سلامت تبدیل شده است و پژوهش‌های گسترده‌ای برای یافتن داروهای موثر و فاقد اثرات جانبی در این زمینه انجام شده است. گزارشات نشان می‌دهد که قارچها به عنوان یک سلسله‌ی گسترده از یوکاریوت‌ها مولد بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان نسل جدید آنتی بیوتیک ها بوده و گزینه ی مناسبی برای معرفی مولکول‌های زیستی جدید با خواص ضد میکروبی هستند. بسیاری از این پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت ضد توموری بوده و ضمن ایجاد مرگ و میر در بسیاری از سلول‌های سرطانی از رشد آنها با مکانیسم‌های کمتر شناسایی شده جلوگیری می‌نمایند. معرفی مواد با اثرات دارویی مهم و چند گانه از قارچ ها، این موجودات را به یک منبع مهم جهت جداسازی و شناسایی مولکول های جدید فارماکولوژیک تبدیل نموده است. مقاله حاضر به مرور ویژگی‌ها و مکانیسم عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی جداسازی شده از قارچ ها پرداخته و طیف ضد میکروبی هر کدام از پپتیدها را مورد بررسی قرار می‌دهد.

واژهای کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای قارچی، نسل جدید آنتی بیوتیک ها، آنتی بیوتیک های پپتیدی

مقدمه

آنتی بیوتیک ها به طور قابل ملاحظه‌ای کیفیت زندگی را بهبود بخشیده‌اند. متاسفانه در سالهای اخیر، استفاده‌ی بیش از حد از آنتی بیوتیک ها موجب ظهور مقاومت‌های چند گانه میکروارگانیسم‌ها شده است (۱). لذا در سالهای اخیر یکی از بزرگترین چالش‌ها یافتن موادی به عنوان آنتی بیوتیک بوده که امکان استفاده از آن در پزشکی مقدور باشد و در منابع زیستی طبیعی پیدا شوند (۲). آنتی بیوتیک‌ها معمولاً به صورت شیمیایی سنتز شده و نقطه ضعف آنها ظهور مقاومت در میکروارگانیسم‌های بیماری زا و همچنین القاء برخی از اثرات جانبی بر روی بیماران می‌باشد. اخیراً پپتیدهایی با فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند. این پپتیدها کوچک بوده، به صورت زیستی ساخته شده و بسیار اختصاصی عمل کرده و اثرات جانبی کمتری دارند(۳و۲). در توسعه‌ی آنتی بیوتیک های جدید، پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان نسل جدید آنتی بیوتیک ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. این پپتیدها تقریباً از همه‌ی موجودات زنده اعم از پروکاریوت ها و انسان جداسازی شده و قادر به مقابله با طیف گسترده‌ای از آلودگی‌ها و عوامل عفونی از جمله عوامل باکتریایی، قارچی، انگل‌ها و ویروس‌ها بوده و بسیاری از آنها برای تعداد قابل توجهی از سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی خاصیت سمی داشته (۱) و علاوه بر القاء اثر مهاری بر رشد، سبب از بین رفتن آن‌ها می‌شوند. (جدول ۱)

جدول ۱ – برخی از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های رایج (۴)

باکتری‌ها	رنگ گرم	نوع تنفس	مقاومت مشکل ساز باکتری
Staphylococcus aureus	+	بی هوازی اختیاری	بتالاکتام ها و گلیکوپپتید ها
Enterococci	+	بی هوازی اختیاری	بتالاکتام ها، گلیکوپپتید ها و آمینوگلیکوزید ها
Streptococcus pneumoniae	+	بی هوازی مقاوم به هوا	بتالاکتام ها، ماکرولید ها و کوئینولون ها
Clostridium difficile	+	بی هوازی اجباری	بتالاکتام ها و کوئینولون ها
Mycobacterium tuberculosis	+	هوازی	کوئینولون ها، ریفامیسین ها و آمینوگلیکوزید ها
Escherichia coli	–	بی هوازی اختیاری	کوئینولون ها، بتالاکتام ها و آمینوگلیکوزید ها
Pseudomonas aeruginosa	–	بی هوازی اختیاری	همه کلاس‌ها به جز پلی میکسین ها
Acinetobacter	–	بی هوازی اختیاری	همه کلاس‌ها
Klebsiella pneumoniae	–	بی هوازی اختیاری	بتالاکتام ها، کوئینولون ها و آمینوگلیکوزید ها
Enterobacter	–	بی هوازی اختیاری	بتالاکتام ها و کوئینولون ها
Neisseria gonorrhoeae	–	هوازی	بتالاکتام ها، کوئینولون ها، تتراسیکلین ها و ماکرولید ها

طبقه بندی پپتیدهای ضد میکروبی

پپتیدهای ضد میکروبی را بر اساس بار و ترکیبات آمینو اسیدی به چهار دسته تقسیم بندی می‌نمایند:

۱- پپتیدهای کاتیونی که دارای آمینو اسیدهای خاصی می‌باشند: این پپتیدها غنی از پرولین، آرژنین، تریپتوفان، فنیل آلانین و گلیسین می‌باشند. آبائیسین[۱]، آپیدیسین[۲] که از زنبور عسل گرفته شده‌اند و یا ایندولیسیدین[۳] که از چارپایان[۴] گرفته شده است، مثال‌هایی از این دسته می‌باشند.

۱. abaecin
۲. apidaecin
۳. indolicidine
۴. cattle

۲- پپتیدهای کاتیونی و خطی که دارای ساختار هلیکس آلفا می‌باشند: این پپتیدها فاقد سیستئین می‌باشند. سکروپین‌ها[۵]، آندروپین[۶]، موریسین[۷] و ملیتین[۸] که از حشرات جدا شده‌اند، مثال‌هایی از این دسته می‌باشند.

۳- پپتیدهای آنیونی: این دسته غنی از آمینو اسیدهای گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید می‌باشند. مکسیمین اچ[۹] که از دوزیستان جداشده و یا درمیسیدین[۱۰] که از انسان جدا

۵. cecropins
۶. andropin
۷. moricin
۸. mellitin
۹. maximin H5
۱۰. dermcidin

شده است را می‌توان به عنوان نمونه از این دسته نام برد.

۴- پپتیدهای کاتیونی و پپتیدهای آنیونی که دارای آمینو اسید سیستئین می‌باشند: این پپتیدها دارای ۱ تا ۳ پیوند دی سولفیدی می‌باشند. برای نمونه بروینین‌ها[۱۱]، پروتگرین‌ها[۱۲] و دیفنسین‌ها[۱۳] را می‌توان از این دسته بر شمرد.

دیفنسین‌ها

اصطلاح دیفنسین به دسته‌ای از پپتیدها گفته می‌شود که وظیفه‌ی محافظت از میزبان را بر عهده دارند. این پپتیدها تقریباً در همه موجودات از جمله مهره داران، بی مهرگان، گیاهان و قارچ‌ها وجود داشته و دارای شباهت ساختاری می‌باشند. اساس شباهت ساختاری این پپتیدها صفحات بتا ناهمسویی می‌باشند که به وسیله‌ی پیوندهای دی سولفید پایدار شده‌اند. البته در برخی از خانواده‌های این پپتیدها هلیکس آلفا هم وجود دارد (۵).

دیفنسین های قارچی

این پپتیدها هم مشابه با دیفنسین های جداسازی شده از انسان، پپتیدهایی با خاصیت ضد میکروبی بوده و ساختار مشترک از نظر پیوندهای دی سولفیدی را به اشتراک می‌گذارند.

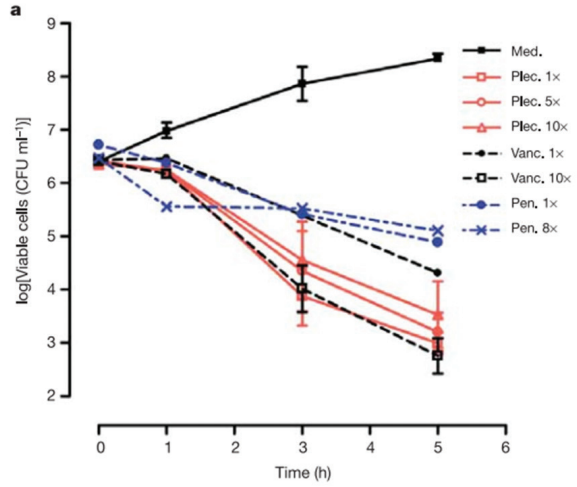
پلکتاسین[۱۴]

این پپتید اولین دیفنسین قارچی می‌باشد که در سال ۲۰۰۵ از قارچ Pseudoplectania nigrella که یک قارچ ساپروفیت از رده‌ی آسکومیست ها بوده و در جنگل‌های کاج شمال اروپا موجود می‌باشد، تخلیص گردید.

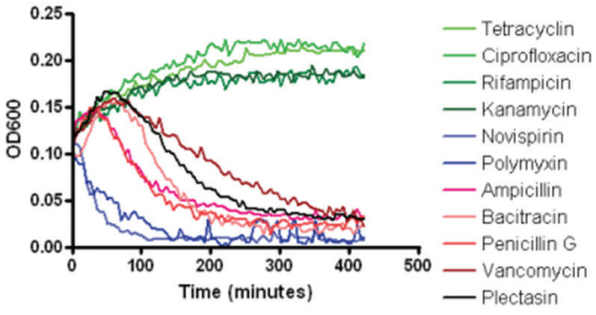
در بررسی‌هایی که بر روی این پپتید انجام شد، مشخص شد که قالب خواندن باز[۱۵] این پپتید ۹۵ اسید آمینه را کد می‌کند که آمینو اسیدهای ۱-۲۳ آن سیگنال پپتید، آمینو اسیدهای ۲۴-۵۵ پروپپتید بوده و آمینو اسیدهای ۵۶-۹۵ آن که ۴۰ آمینو اسید می‌باشد، ساختار بالغ این پپتید را تشکیل می‌دهد. وزن این پپتید در حدود ۴/۴ کیلو دالتون بوده و متشکل از دو صفحه بتای ناهمسو و یک مارپیچ آلفا می‌باشد که به وسیله سه پیوند دی سولفیدی پایدار شده‌اند. این پپتید دارای فعالیت بر ضد باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. خواص سمیت سلولی این پپتید بر روی سلول‌های فیبروبلاست موشی L929 و کراتینوسیت های پوستی انسان بررسی شد و مشخص گردید که این پپتید فاقد هرگونه سمیت سلولی بر روی رده‌های تست شده می‌باشد. همچنین خواص همولیتیک آن برای لیز گلبول‌های قرمز هم بررسی شده که فاقد خاصیت همولیتیک گزارش شده است (۶) .

مکانیسم عمل پلکتاسین

اندازه‌گیری سرعت رشد باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتلیس[۱۶] تیمار شده با پلکتاسین مبین رفتاری مشابه با عواملی بودند که با ساخت دیواره سلولی تداخل ایجاد می‌نمودند (مثل ونکومایسین[۱۷] و پنی سیلین[۱۸] و باسیتراسین[۱۹]). بررسی‌های مورفولوژیک که انجام شد نشانگر تغییر شکل و دفرمه شدن باکتری‌ها نبوده و پتانسیل غشا را برهم نمی‌زند(۶). (شکل ۱ و ۲)



شکل ۱- مقایسه plectasin با vancomycin و penicillin بر ضد باکتری S. pneumoniae serotypes 2 (D39)



شکل ۲- مقایسه کینتیک رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با دیگر آنتی بیوتیک ها

در بررسی‌هایی که به منظور بررسی محل اثر پلکتاسین صورت گرفت مشخص شد که پلکتاسین با اتصال استیومتریک ۱ به ۱

۱۱. brevinins
۱۲. protegrin
۱۳. defensins
۱۴. plectasin
۱۵. Open reading frame

۱۶. Bacillus subtilis
۱۷. vancomycin
۱۸. penicillin
۱۹. bacitracin

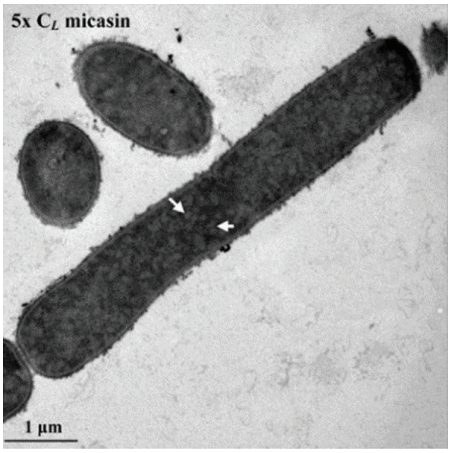
به پیش ساز II دیواره سلولی باعث مهار ساخت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت گردیده و از این طریق رشد باکتری را مهار می‌نماید(۷).

یوروسین[۲۰]

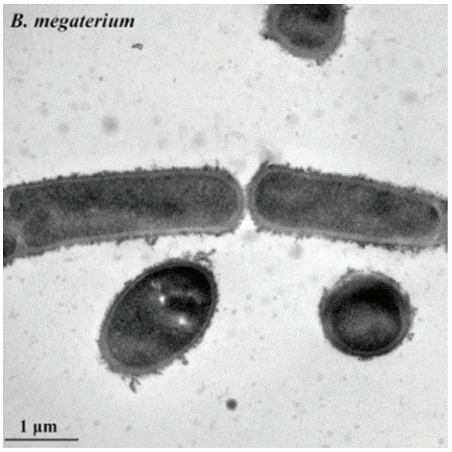
این پپتید در سال ۲۰۱۲ از قارچ Eurotium amstelodami جداسازی شد. در بررسی خواص ضد میکروبی، مشاهده گردید که این پپتید دارای فعالیت ضد باکتریایی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت بوده و اثری بر روی باکتری‌های گرم منفی ندارد. ژن این پپتید ۹۰ اسید آمینه را کد می‌کند که در این بین، آمینو اسید ۱-۲۰ سیگنال پپتید، آمینو اسید ۲۱-۴۸ بخش پروپپتید و آمینو اسید ۴۹-۹۰، پپتید بالغ که حاوی ۴۲ اسید آمینه می‌باشد را تشکیل می‌دهد. این پپتید دارای وزن مولکولی ۴/۳ کیلو دالتون بوده که مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتای آن به وسیله‌ی پیوندهای دی سولفیدی پایدار شده است. در بررسی‌هایی که به منظور یافتن مکانیسم این پپتید صورت گرفت، مشخص شد که این پپتید هم مشابه پلکتاسین عمل نموده و از طریق اتصال به لیپید II باعث مهار ساخت دیواره‌ی سلولی می‌گردد. این پپتید فاقد تأثیر بر روی غشاء باکتری می‌باشد (۸).

میکاسین[۲۱]

میکاسین در سال ۲۰۱۲ از قارچ Microsporum canis که از درماتوفیت های نسبتاً شایع در ایران می‌باشد، جداسازی شد. این پپتید مانند موارد مذکور، دارای بخش سیگنال پپتید بوده و پپتید بالغ آن ۳۸ اسید آمینه طول داشته و وزنی در حدود ۴ کیلو دالتون را به نمایش می‌گذارد. طیف ضد باکتریایی این پپتید گسترده‌تر از موارد قبلی بوده و بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای فعالیت کشندگی می‌باشد. در بررسی نفوذ پذیری غشاء که توسط روش اتصال رنگ پروپیدیوم یدید فلورسنت به اسیدهای نوکلئیک[۲۲] انجام شد، مشخص شد که این پپتید هیچ منفذی در غشا ایجاد نمی‌نماید. عدم ایجاد نفوذپذیری در غشاء در محدوده غلظت کشندگی این پپتید، این پیشنهاد را موجب شد که میکاسین به واسطه ساختار کلی غیر آمفیپاتیک[۲۳] خود، یک پپتید مخرب غشا نمی‌باشد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشخص شد که میکاسین هیچ گونه تغییری را بر روی مورفولوژی باکتری گرم مثبت B. megaterium تیمار شده با میکاسین نمی‌گذارد البته مقایسه سلول طبیعی با سلول تیمار شده در غلظت ۵ برابر غلظت کشندگی (CL) پس از ۹۰ دقیقه تیمار مشخص نمود که عملکرد این پپتید بر خلاف عملکرد پلکتاسین بوده و درون سلول‌های تیمار شده با میکاسین، بعضی از پروتئین‌های داخل سلولی که به صورت شبه ذره‌ای تجمع نموده‌اند، مشاهده شد. این در حالی است که درون سلول‌های تیمار نشده، این تجمعات مشاهده نشد (شکل ۱ و ۲). این مشاهدات موجب شد تا پیشنهاد شود که میکاسین، سلول‌های باکتریایی را از طریق عملکرد داخل سلولی و از طریق اثر گذاری بر روی فولد گیری پروتئین از بین می‌برد (۹). عملکرد مشابه به این قبلاً برای بعضی از پپتیدهای ضد میکروبی حشرات که فعالیت کشندگی آنها از طریق مهار چپرون‌های chaperone دخیل در فولد گیری پروتئین می‌باشد، گزارش شده است (۱۰). با این حال جزئیات مکانیسم میکاسین نیازمند پژوهش‌های بیشتری می‌باشد (۹).



شکل ۳- B.megaterium تیمار شده با ۵ برابر غلظت کشندگی میکاسین



شکل ۴- B. megaterium تیمار نشده با میکاسین

کوپسین[۲۴]

این پپتید در سال ۲۰۱۴ از قارچ Coprinopsis cinerea جداسازی شد. ژن این پپتید در مجموع ۱۸۴ اسید آمینه را

۲۰. eurocin
۲۱. micasin
۲۲. dye propidium iodide fluorescent nucleic acid-binding
۲۳. nonamphiphilic
۲۴. copsin

کد می‌کند. با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک پیش بینی شده است که آمینو اسیدهای ۱-۲۳ سیگنال پپتید، همچنین آمینو اسیدهای ۲۴-۱۲۷ پروپپتید و نهایتاً ۵۷ اسید آمینه‌ی موجود در بخش انتهایی پپتید، پپتید بالغ می‌باشند که به آن کوپسین می گویند. وزن مولکولی این پپتید ۶۰۵۹/۵ دالتون بوده و دارای خاصیت ضد باکتریایی برای باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. این پپتید اثر قابل توجهی بر روی باکتری‌های گرم منفی ندارد (۱۱). فعالیت ضد باکتریایی و اختصاصیت کوپسین، با آنتی بیوتیک هایی مثل پلکتاسین و ونکومایسین که با ساخت دیواره سلولی تداخل می‌کنند، قابل مقایسه می‌باشد. در بررسی بیشتر اهداف مولکولی کوپسین مشخص گردید که کوپسین به سومین اسید آمینه (لیزین) موجود در پپتید ۵ اسید آمینه‌ی موجود در لیپید II متصل شده و از این طریق باعث مهار ساخت دیواره سلولی باکتری می‌گردد (۱۱). (جدول ۲)

جدول ۲– حساسیت باکتری‌های مختلف به پپتیدهای قارچی

پپتید	باکتری‌های حساس	منابع
پلکتاسین	باکتری‌های گرم مثبت Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Corynebacterium spp., Bacillus spp	(۶)
یوروسین	باکتری‌های گرم مثبت	(۸)
میکاسین	باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Staphylococcus spp., Micrococcus luteus, Bacillus cereus Pseudomonas aeruginosa, Agrobacterium tumefaciens, Escherichia coli	(۹)
کوپسین	باکتری‌های گرم مثبت B. subtilis, Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Listeria spp., Enterococcus spp., Micrococcus luteus spp.	(۱۱)

پپتیدهای ضد قارچی

این پپتیدها که اکثراً به وسیله‌ی قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند، بسیار کوچک، دارای خاصیت بازی و غنی از سیستئین بوده که باعث ایجاد سه و یا چهار پل دی سولفیدی می‌گردند (۱۳و۱۲). این پپتیدها غالباً به شکل پری- پرو- پپتید بالغ ساخته می‌شوند و در داخل میزبان دارای فرم غیر فعال بوده و از این طریق باعث محافظت میزبان از این پپتید می‌شوند.

پپتید ضد قارچی AFP[۲۵]

منشاء این پپتید، قارچ آسپرژیلوس جیگانتیوس[۲۶] می‌باشد.

پیش ساز این پپتید دارای ۹۴ اسید آمینه بوده و در هنگام پردازش، قسمتی از آن جدا می‌گردد و نهایتاً ۵۱ اسید آمینه از آن باقی می‌ماند. این پپتید بالغ حاوی تعداد زیاد سیستئین (هشت)، تیروزین (شش) و لیزین (دوازده) می‌باشد.

هنگامی که این پپتید در غلظتی کمتر از حداقل غلظت مهاری استفاده می‌گردد، دارای قابلیت بازدارندگی رشد بوده و هنگامی که در غلظت برابر و یا بیشتر از حداقل غلظت مهاری استفاده گردد، دارای فعالیت کشندگی بر ضد قارچ‌های حساس می‌باشد. لازم به ذکر است که مخمر (ساکارومیسز سرویزیه و کاندیدا آلبیکنز) و یا باکتری‌ها (برای مثال E.coli و باسیلوس سابتیلیس) در حضور این پپتید متأثر نمی‌گردند (۱۴). با استفاده از میکروسکوپ TEM، مورفولوژی هیف آسپرژیلوس نیجر تیمار شده با AFP بررسی گردید و مشخص شد که:

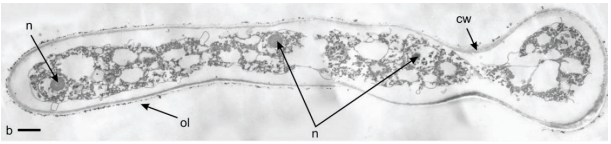
دیواره سلولی ظاهراً سالم و سیتوپلاسم دچار فروپاشی شده است.

همه ساختارهای درون سلولی شروع به فروپاشی نموده‌اند.

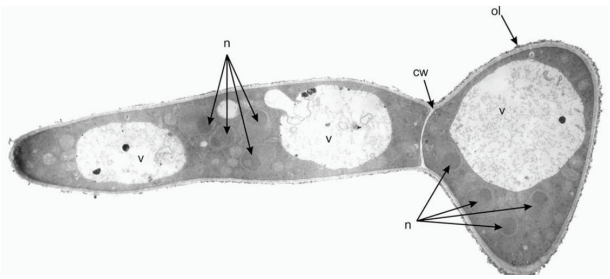
واکئول های زیادی در سلول تشکیل شده که بیشتر آنها دارای شکل غیر معمول هستند.

هسته هنوز حضور دارد ولی غشا خود را تا حدودی از دست داده است (۱۵). (شکل ۵ و ۶)

در بررسی‌های بعدی که به منظور یافتن مکانیسم عملکرد این پپتید صورت گرفت مشخص شد که AFP باعث نفوذپذیری غشا شده و همچنین با مهار آنزیم کیتین سنتاز باعث ممانعت در ساخت کیتین شده و مرگ قارچ را به دنبال می‌آورد (۱۶-۱۸).



شکل ۵– A. niger تیمار شده با AFP



شکل ۶– A. niger تیمار نشده با AFP

۲۵. Antifungal protein
۲۶. Aspergillus gigenteus

پپتید ضد قارچی PAF [۲۷]

این پپتید دارای ۵۵ آمینو اسید بوده و وزنی معادل ۶,۲۵ کیلو دالتون را دارا بوده و غنی از آمینو اسیدهای سیستئین و لیزین می‌باشد. منشأ PAF قارچ Penicillium chrysoge-num بوده و به صورت پیش ساز ساخته می‌شود. PAF دارای توالی سیگنال ۱۸ آمینو اسیدی، بخش پروپپتید که ۱۹ اسید آمینه موجود در N ترمینال را دربر گرفته و قبل از اینکه به خارج ترشح گردد، حذف می‌گردد و در نهایت پپتید بالغ شامل ۵۵ آمینو اسید، می‌باشد که به محیط کشت ترشح می‌شود. این پپتید دارای خواص ضد قارچی بوده و فاقد فعالیت ضد باکتریایی می‌باشد (۱۹). در سالهای اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران به این پپتید معطوف شده و کاربردهای آن به عنوان دارویی برای بیماری آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی برای مدل‌های آزمایشگاهی در حال بررسی می‌باشد (۲۱ و ۲۰).

پپتید ضد قارچی NAF [۲۸]

این پپتید توسط قارچ P.nalgiovense تولید شده و ژن آن همولوگ ژن paf در P.chrysogenum می‌باشد. ناحیه کد کننده‌ی ژن naf تنها در سه ناحیه با ژن کد کننده paf از P.chrysogenum تفاوت دارد که دو جهش اول آن در بخش سیگنال پپتید و پرو پپتید هستند و جهش سوم آن درون ناحیه کد کننده پپتید بالغ قرار دارد ولی این تغییر خنثی می‌باشد چرا که کدون آمینو اسید لیزین در جایگاه ۳۴ (با توجه به پپتید بالغ) از AAA به AAG تغییر یافته است و تغییری در آمینو اسید کد کننده ایجاد نشده و لیزین کد می‌شود بنابر این پپتید بالغ مشابه با PAF می‌باشد (۲۲).

پپتید ضد قارچی pgAFP

این پپتید هم از قارچ P.nalgiovense به محیط کشت ترشح می‌گردد. پیش ساز این پپتید دارای ۹۲ آمینو اسید بوده و پس از پردازش، ۵۸ اسید آمینه، پپتید بالغ را تشکیل می‌دهد. در آنالیز این پپتید مشخص شد که ۱۸ آمینو اسید اول این پیش ساز، سیگنال پپتید و آمینو اسیدهای ۱۹-۳۸ مسئول بخش پرو پپتید می‌باشند و در پپتید بالغ حضور ندارند. وزن این پپتید ۶۵۰۰ دالتون بوده و دارای نقطه ایزو الکتریک ۸/۸ می‌باشد (۲۳).

پپتید ضد قارچی AnAFP [۲۹]

این پپتید ضد قارچی دارای ۶ آمینو اسید سیستئین بوده و از محیط کشت قارچ Aspergillus niger جداسازی شده است. این پپتید دارای ۵۸ اسید آمینه بوده و وزنی معادل ۶۵۸۲/۶۳ دالتون دارد. AnAFP دارای اثر ضد قارچی بر روی قارچ‌های رشته‌ای و مخمر بوده و بر روی باکتری‌ها اثری ندارد (۲۴).

پپتید ضد قارچی Bubble protein

این پپتید از محیط کشت قارچ Penicillium brevicompactum تخلیص شده و دارای وزن مولکولی ۱۳±۶۵۸۴ دالتون می‌باشد. با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک، پیش بینی شده که آمینو اسید ۱ تا ۱۸ در پیش ساز پپتید نقش سیگنال پپتید را ایفا نموده و آمینو اسید ۱۹ تا ۳۳ بخش پروپپتید را تشکیل می‌دهند (۲۵).

پپتید ضد قارچی NFAP [۳۰]

این پپتید از محیط کشت قارچ Neosartorya fischeri که فرم تلومورف قارچ Aspergillus fischerianus می‌باشد جداسازی شد. وزن مولکولی این پپتید در حدود ۶/۶ کیلو دالتون بوده و دارای فعالیت ضد قارچی بر ضد قارچ‌های رشته‌ای می‌باشد. لازم به ذکر است که این پپتید دارای ۵۷ اسید آمینه می‌باشد (۲۶).

جدول۳: حساسیت قارچ‌ها به پپتیدهای ضد قارچی

نام پپتید	قارچ‌های حساس و دارای اهمیت بیشتر	منابع
AFP	F. oxysporum, F. moniliforme, F. graminearum, F. poae, F. sporotrichoides, B. cinerea, E. graminis, M. grisea, P. infestans, A. alternata, P. recondita, S. graminicola	(۱۴)
PAF	B. cinerea, F. oxysporum, F. sambucinum, C. carbonum,T. koningii, A. flavus, P. graminis, P. recondite, A. fumigatus	(۱۹)
AcAFP	F. oxysporum, F. solani, B. cinerea, A. solani, A.niger. A. solani	(۲)
BP	S. cerevisiae	(۲۵)
NFAP	F. graminearum, mucor sp., A. flavus, Byssochlamys sp, F. solani, Geotrichum candidum, P. roqueforti, P. italicum, P. digitatum	(۲۶)
AnAFP	A. flavus, A. fumigatus, F. oxysporum, F. solani, Candida albicanse	(۲۴)
PgAFP	A. flavus	(۲۳)

پپتید ضد قارچی AcAFP [۳۱]

این پپتید از قارچ Aspergillus clavatus جداسازی شده و دارای وزنی در حدود ۵۷۷۳ دالتون می‌باشد. پیش ساز این پپتید دارای ۹۴ اسید آمینه بوده که با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک پیش بینی شده که این پیش ساز دارای بخش سیگنال پپتید بوده و ۲۱ اسید آمینه اول به عنوان سیگنال

۲۷. Penicillium antifungal peptide
۲۸. P.nalgiovense antifungal peptide
۲۹. Aspergillus niger antifungal protein
۳۰. Neosartorya fischeri Antifungal protein
۳۱. Aspergillus clavatus Antifungal protein

پپتید شناسایی گردید. از طرفی چون ۲۲ اسید آمینه بعد از سیگنال پپتید، در پپتید بالغ موجود نبود، مشخص شد که این بخش که شامل ۲۲ اسید آمینه می‌باشد، بخش پرو پپتید را در بر می‌گیرد. نهایتاً پپتید بالغ شامل ۵۱ اسید آمینه ترشح می‌گردد (۲).(جدول ۳)

سایر پپتیدها

به علت اینکه این دسته از پپتیدها توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید نمی‌شوند، در دسته‌ای جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

پپتید Cordymin

این پپتید از قارچ Cordyceps militaris که یک قارچ نسبتا پر اهمیت از منظر پزکی در چین باستان می باشد جداسازی و تخلیص کردیده است. وزن مولکولی این پپتید ۱۰۹۰۶ دالتون بوده و دارای خاصیت مهاری رشد میسل در قارچ‌های حساس مهار می‌باشد. این پپتید همچنین فعالیت آنزیم رونوشت بردار معکوس را در ویروس HIV-1 مهار می‌کند. Cordymin از پپتیدهایی می‌باشد که دارای فعالیت ضد سرطانی می‌باشد. در بررسی فعالیت‌های آن مشخص شده است که این پپتید اثر ضد تکثیری بر ضد فعالیت سرطان سینه (MCF7) را دارا می‌باشد. این در حالی است که فاقد فعالیت بر ضد سرطان کولون (HT-29) می‌باشد (۲۷).

پپتید Eryngin

این پپتید از اندام های باروری قارچ خوراکی Pleurotus eryngii جداسازی و دارای وزنی معادل ۱۰ کیلو دالتون بوده و دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشد. در تست هایی که به منظور بررسی فعالیت نوکلئازی و فعالیت لکتینی این پپتید صورت گرفت، مشخص شد که این پپتید فاقد این عملکرد ها می باشد (۲۸). (جدول۴)

جدول۴: فعالیت ضد قارچی پپتیدی

نام پپتید	فعالیت‌های پپتید	منابع
Cordymin	فعالیت ضد قارچی بر ضد: Bipolaris maydis، Mycosphaerella arachidicola، Rhizoctonia solani, Candida albicans مهار آنزیم رونوشت بردار معکوس در HIV دارای فعالیت ضد سرطانی بر ضد رده سلولی MCF-7	(۲۷)
Eryngin	فعالیت ضد قارچی بر ضد: Fusarium oxyporum و Mycosphaerella arachidicola	(۲۸)

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی عملکرد پپتید های ضد میکروبی از نفوذ پذیر نمودن غشا گرفته تا عمل بر روی مولکول‌های هدف درون سلولی (شامل مولکول‌هایی که فعالیت واسطه‌گری ایمنی دارند) را در بر می‌گیرد. فعالیت تشکیل منفذ، عملکرد کلاسیک این خانواده از پپتیدها می‌باشد و بسته به نوع پپتید و شرایط محیطی تغییر می‌کند (۲۹). مقاومت میکروارگانیسم‌ها بر ضد این پپتیدها به کندی به وجود می‌آید و این باعث شده است تا این پپتیدها به عنوان کاندیدی مناسب برای نسل جدید آنتی بیوتیک ها مطرح گردیده و موجب تحقیقات گسترده برای یافتن پپتیدهای جدید شوند (۱). پلکتاسین به عنوان اولین دیفنسین قارچی در حال طی کردن مراحل پیش بالینی بوده و تولید انبوه آن با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک بررسی شده است (۳۱و۳۰). همچنین رهایش دارویی پلکتاسین با استفاده از نانو ذرات PLGA مورد بررسی قرار گرفته و نتایج جالب توجهی را به دنبال داشته است (۳۲). پلکتاسین، کوپسین و یوروسین بر ضد باکتری‌های گرم مثبت فعالیت داشته و می‌توانند جایگزین مناسبی برای ونکومایسین و پنی سیلین باشند. با این حال توسعه ی آنها در کاربرد های بالینی نیاز به تحقیقات گسترده و طی مراحل مختلفی دارد. پپتیدهای ضد قارچی به مقدار زیادی توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید شده و مقاومت دارویی نسبت به آنها تا کنون گزارش نشده است. اگر چه این پپتیدها اساس ساختاری مشابهی دارند، با این حال مطالعات بیشتر بر روی پپتیدهای AFP و PAF صورت گرفته و موجب شده است تا این پپتیدها زودتر از سایر پپتیدهای هم خانواده وارد مراحل پیش بالینی گردند. ژن پپتید های ضد قارچی بعضا به گیاهان منتقل شده که باعث مقاومت گیاهان به قارچ های فیتوپاتوژن گردیده است (۳۷-۳۳). تخمین زده شده است که در حدود ۱/۵ میلیون گونه قارچ در جهان وجود دارد (۳۸). از طرفی به علت اینکه قارچ‌ها، مولد پروتئین‌ها و پپتیدهایی با فعالیت بیولوژیک شامل فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و بعضاً سمیت بر ضد سلول‌های سرطانی می‌باشند، می‌توان آنها را منبعی ارزشمند برای مقابله با سرطان و مقاومت‌های میکروبی ارزیابی نمود (۳۹). این امید وجود دارد تا با تکیه بر این سلسله از یوکاریوت‌ها بتوان ۴۰ سال عدم نوآوری در تولید عوامل ضد میکروبی و بروز مقاومت‌های باکتریایی را کاهش داد.

تقدیر و تشکر

از کلیه اعضای هیئت علمی، مخصوصا آقای دکتر هنری، پژوهشگران و دانشجویان محترم مرکز زیست شناسی نهایت تشکر و قدردانی را داشته و تعالی روز افزون آنان را از خداوند منان مسئلت می‌نمایم.

مراجع

1. Singh N, Abraham J. Ribosomally synthesized peptides from natural sources. J Antibiot (Tokyo). 2014;67(4):277-89.

2. Skouri-Gargouri H, Gargouri A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by Aspergillus clavatus. Peptides. 2008;29(11):1871-7

3. Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from Aspergillus clavatus ES1: biochemical and molecular characterization. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010;37(8):805-13.

4. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25-64.

5. Kastin A, editor. Handbook of biologically active peptides. Academic press; 2013 Jan 26.

6. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature. 2005;437(7061):975-80.

7. Schneider T, Kruse T, Wimmer R, Wiedemann I, Sass V, Pag U, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. Science. 2010;328(5982):1168-72.

8. Oeemig JS, Lynggaard C, Knudsen DH, Hansen FT, Nørgaard KD, Schneider T, et al. Eurocin, a new fungal defensin: structure, lipid binding, and its mode of action. J Biol Chem. 2012;287(50):42361-72.

9. Zhu S, Gao B, Harvey PJ, Craik DJ. Dermatophytic defensin with antiinfective potential. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(22):8495-500.

10. Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007;5(6):951-9.

11. Essig A, Hofmann D, Münch D, Gayathri S, Künzler M, Kallio PT, et al. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. J Biol Chem. 2014;289(50):34953-64.

12. Hegedüs N, Marx F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? Fungal Biol Rev. 2013;26(4):132-145.

13. Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;65(2):133-42.

14. Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;78(1):17-28.

15. Theis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of Aspergillus giganteus. Res Microbiol. 2005;156(1):47-56.

16. Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. The antifungal protein from Aspergillus giganteus causes membrane permeabilization. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):588-93.

17. Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from Aspergillus giganteus inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. Appl Environ Microbiol. 2007;73(7):2128-34.

18. Moreno AB, Martínez Del Pozo A, San Segundo B. Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Antifungal mechanism of the Aspergillus giganteus AFP against the rice blast fungus Magnaporthe grisea. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;72(5):883-95.

19. Marx F, Binder U, Leiter E, Pócsi I. The Penicillium chrysogenum antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. Cell Mol Life Sci. 2008;65(3):445-54.

20. Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, et al. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of Penicillium chrysogenum (PAF). Toxicol Appl Pharmacol. 2013;269(1):8-16.

21. Palicz Z, Gáll T, Leiter É, Kollár S, Kovács I, Miszti-Blasius K, et al. Application of a low molecular weight antifungal protein from Penicillium chrysogenum (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice. Emerg Microbes Infect. 2016;5(11):e114.

22. Geisen R. P. nalgiovense carries a gene which is homologous to the paf gene of P. chrysogenum which codes for an antifungal peptide. Int J Food Microbiol. 2000;62(1-2):95-101.

23. Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of Penicillium chrysogenum. Peptides. 2010;31(4):541-7.

24. Gun Lee D, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from Aspergillus niger. Biochem Biophys Res Commun. 1999;263(3):646-51.

25. Seibold M, Wolschann P, Bodevin S, Olsen O. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. Peptides. 2011;32(10):1989-95.

26. Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Isolation and characterization of Neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP). Peptides. 2011;32(8):1724-31.

27. Wong JH, Ng TB, Wang H, Sze SC, Zhang KY, Li Q, et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus Cordyceps militaris. Phytomedicine. 2011;18(5):387-92.

28. Wang H, Ng TB. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom Pleurotus eryngii. Peptides. 2004;25(1):1-5.

29. Rahnamaeian M. Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses. Plant Signal Behav. 2011;6(9):1325-32.

30. Jing XL, Luo XG, Tian WJ, Lv LH, Jiang Y, Wang N, et al. High-level expression of the antimicrobial peptide plectasin in Escherichia coli. Curr Microbiol. 2010;61(3):197-202.

31. Zhang J, Yang Y, Teng D, Tian Z, Wang S, Wang J. Expression of plectasin in Pichia pastoris and its characterization as a new antimicrobial peptide against Staphyloccocus and Streptococcus. Protein Expr Purif. 2011;78(2):189-96.

32. Water JJ, Smart S, Franzyk H, Foged C, Nielsen HM. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against Staphylococcus aureus in infected epithelial cells. Eur J Pharm Biopharm. 2015;92:65-73.

33. Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Peñas G, Eritja R, Tharreau D, et al. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from Aspergillus giganteus show enhanced resistance to the rice blast fungus Magnaporthe grisea. Plant Mol Biol. 2004;54(2):245-59.

34. Girgi M, Breese WA, Lörz H, Oldach KH. Rust and downy mildew resistance in pearl millet (Pennisetum glaucum) mediated by heterologous expression of the afp gene from Aspergillus giganteus. Transgenic Res. 2006;15(3):313-24.

35. Li Q, Lawrence CB, Xing HY, Babbitt RA, Bass WT, Maiti IB, et al. Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. Planta. 2001;212(4):635-9.

36. Oldach KH, Becker D, Lörz H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. Mol Plant Microbe Interact. 2001;14(7):832-8.

37. Moreno AB, Peñas G, Rufat M, Bravo JM, Estopà M, Messeguer J, et al. Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from Aspergillus giganteus confers resistance to the blast fungus Magnaporthe grisea in transgenic rice. Mol Plant Microbe Interact. 2005;18(9):960-72.

38. Wu J, Gao B, Zhu S. The fungal defensin family enlarged. Pharmaceuticals (Basel). 2014;7(8):866-80.

39. Singh SS, Wang H, Chan YS, Pan W, Dan X, Yin CM, et al. Lectins from edible mushrooms. Molecules. 2014;20(1):446-69.