

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG6180159

Project Title : Design, synthesis and characterization of antimicrobial and antibiofilm peptides derived from *Crocodylus siamensis* hemoglobin with high bacterial cell selectivity

Investigator : Assist. Prof. Dr. Nisachon Jangpromma

E-mail Address : nisaja@kku.ac.th

Project Period : 2 Years

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สยาม (*Crocodylus siamensis*) พบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย คือ เปปไทด์ QL17 (QAIHNEKVQAHGKKVL) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพ ลดการอักเสบ และลดการเกิดออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเปปไทด์ให้มีความจำเพาะของฤทธิ์ทางชีวภาพมากยิ่งขึ้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ทำการออกแบบเปปไทด์ชนิดใหม่โดยใช้เปปไทด์ดังกล่าวเป็นแม่แบบ การออกแบบทำโดยการเพิ่มประจุบวกให้กับเปปไทด์ด้วยกรดอะมิโน lysine (K) และ arginine (R) ในขณะที่ความเป็นไฮโดรโฟบิกของเปปไทด์นั้นจะเพิ่มด้วยการเติมกรดอะมิโน tryptophan (W) โดยจะใช้แผนภาพจาก helical wheel projection ในการทำนายโครงสร้างของเปปไทด์ จากผลการออกแบบเปปไทด์ทำให้ได้เปปไทด์เส้นใหม่จำนวน 5 เส้น ได้แก่ IL15NJ1 (IKHWEKVWKHGKKVL), IL15NJ2 (IKHWKKVWKHGKKVL), IL15NJ3 (IKHWKKVWKHAKKVL), IL15NJ4 (IKHWKKVWKHWKKKL) และ IL15NJ5 (IRHWRRVWRHWRRRL) ซึ่งมีประจุบวก +4, +6, +6, +7, +7 ตามลำดับ และมีค่าไฮโดรโฟบิกเฉลี่ยในช่วง 40-46% เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าเปปไทด์ทั้ง 5 เส้น มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และมีความเป็นพิษต่ำทั้งต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (human red blood cell), เซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cell; PBMC), เซลล์เคอราติโนไซด์จากมนุษย์ (HaCaT), เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (human fibroblast cell) และเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาความจำเพาะของเปปไทด์ต่อแบคทีเรีย พบว่าเปปไทด์ IL15NJ3 แสดงความจำเพาะสูงสุดในการทำลายเชื้อ

แบคทีเรียโดยแสดงค่า selectivity index ถึง 500 เมื่อเทียบกับเปปไทด์แม่แบบ และจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค flow cytometry สามารถยืนยันได้ว่าเปปไทด์ IL15NJ3 มีความจำเพาะในการทำลายเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์ ผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ IL15NJ3 มีกลไกในการเข้าทำลายแบคทีเรียผ่านทางเมมเบรน นอกจากนี้เปปไทด์ IL15NJ3 ยังแสดงกิจกรรมด้านการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้ เมื่อทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มเมื่อได้รับเปปไทด์ IL15NJ3 โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่และยึดเกาะกับพื้นผิว เช่น flagellin protein และ type 1 fimbrial protein มีการแสดงออกที่ลดลง รวมถึงการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในระบบ quorum sensing เช่น TrbL protein และ phenazine biosynthesis protein เมื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ พบว่าฮีมโกลบินจากเลือดจะเข้าสู่เยื่อและฮีมโกลบินไฮโดรไลส (CHHs) ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน ที่ความเข้มข้น 125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้วยการลดปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ถูกสร้างขึ้นจากการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยพบว่า CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์การต้านอักเสบได้ดีที่สุด สำหรับเปปไทด์สังเคราะห์ IL15NJ3 ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงกิจกรรมด้านการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังพบกิจกรรมด้านการเกิดออกซิเดชันของ Hb, CHHs และเปปไทด์สังเคราะห์ทุกเส้น ซึ่งจากผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ IL15NJ3 มีศักยภาพอย่างมากในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ทั้งฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความจำเพาะต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในแง่ของการพัฒนาใช้เปปไทด์สำหรับเป็นสารปฏิชีวนะทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต

คำสำคัญ : เปปไทด์ต้านจุลชีพ, ยับยั้งไบโอฟิล์ม, ดื้อยาปฏิชีวนะ, การเลือกเซลล์, จระเข้

Abstract

In a previous study, we reported a peptide derived from *Crocodylus siamensis* hemoglobin hydrolysate, named QL17 (QAIHNEKVQAHGKKVL); that exhibited antimicrobial, anti-inflammation and antioxidant. To improve the antimicrobial activity of this peptide, it was used as the template to design novel effective peptides. The helical wheel diagram was used to monitor and evaluate amphipathic after the position change and substitution of certain amino acids. Lysine (K) and arginine (R) were appropriately selected to extend the hydrophilicity, whereas hydrophobic residues such as leucine (L), isoleucine (I) or tryptophan (W) were used to increase the hydrophobicity. As appropriate, the results of novel peptides design were given 5 peptides; named as IL15NJ1 (IKHWEKVWKHGKKVL), IL15NJ2 (IKHWKKVWKHGKKVL), IL15NJ3 (IKHWKKVWKHAKKVL), IL15NJ4 (IKHWKKVWKHWKKKL) and IL15NJ5 (IRHWRRVWRHWRRRL). There was net charge +4, +6, +6, +7 and +7, respectively which containing hydrophobicity about 40-46%. The results found that all novel designed peptides have potent antimicrobial efficacy than template and less cytotoxic to macrophage cell, human red blood cell, human white blood cell and human skin cell (i.e. human keratinocyte (HaCaT) and normal human dermal fibroblasts (NHDF). The IL15NJ3 displayed great antimicrobial against both Gram-positive and Gram-negative bacterial. The cell selective of IL15NJ3, as selectivity index, indicating the value was increased up to 500-fold compared to QL17 parental peptide. In agreement with the results of cell-selective, the flow cytometry results revealed that IL15NJ3 exhibited antibacterial efficacy over than mammalian cell membranes leading to maximize antimicrobial activity while minimizing to toxicity. The scanning electron microscope showed that IL15NJ3 interacted with outer membrane components, activated a structural modification damaging cell membranes, which lead to death of bacteria cell. Interestingly, IL15NJ3 could inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and successfully disrupted biofilm degradation. Moreover, the protein expression response from *P. aeruginosa* biofilm formation when treated with IL15NJ3 was then investigated using proteomic approach. The result demonstrated that the expression of proteins in the group that acted in the movement and adhesion to the surface, such as flagellin protein and type 1 fimbrial protein was reduced

in their expression level. In addition, the expression of proteins involved in the quorum sensing system, such as TrbL protein and phenazine biosynthesis protein, also decreased. Considering other biological effects, our result found that the intact hemoglobin (Hb) and *Crocodylus siamensis* hemoglobin hydrolysates (CHHs) derived from trypsin and papain digestion at concentrations of 125-500 µg/ml show a decrease in nitric oxide production in a dose-dependent manner. The strongest anti-inflammatory activity was found for CHH derived from 2-h papain hydrolysis. For IL15NJ3 peptide, the results exhibited the reduction of NO production by LPS-stimulated RAW264.7 cell at the concentration of 100 and 200 µg/ml. Finally, Hb, CHHs and all of designed peptides were suppressed free radical which showed antioxidant activity. All observation herein revealed that IL15NJ3 peptide could be promising to develop broad-ranging medical peptides with the ability to treat and prevent against drug-resistant bacteria that produce biofilms via the suppression of bacteria endotoxins and scavenge radical.

Keywords : Antimicrobial peptide, Antibiofilm, Antibiotic resistance, Cell selectivity, Crocodile