بررسی میانکنش پپتید ضد میکروبی سیکلوویولاسین *O2* با غشا باکتری با روش شبیه سازی دینامیک مولکولی

محبوبه ضرابی[۱*]، المیرا نقدی[۲]، صفیه صوفیان[۳]

تاریخ دریافت:۹۵/۰۲/۱۸
تاریخ تصویب: ۹۵/۰۷/۱۳

چکیده

سیکلوتیدها پپتیدهای کوچک غنی از باندهای دی سولفید هستند که از گیاهان جدا شده اند و دارای طیف وسیعی از فعالیت های زیستی شامل فعالیت ضد میکروبی، ضد تومور، حشره کشی و Anti-HIV می باشند. با توجه به افزایش باکتری های مقاوم به دارو، جامعه ی جهانی در حال رویارویی با یک چالش جدی است و نیازی ضروری به ترکیبات جدید برای درمان بیماری ها احساس می شود. سیکلوتید ها به عنوان پپتیدهای کوچک، پتانسیل بالایی برای تبدیل شدن به ترکیبات دارویی نسل آینده را دارند.

در این پژوهش، با هدف بررسی اثر ضد میکروبی سیکلوتید جدا شده از بنفشه ی ایرانی به نام سیکلوویولاسین o2،این پپتید را به غشا مدل باکتری نزدیک کردیم و به مدت ۲۰۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی انجام شد. آنالیز ها نشان داد که سیکلوویولاسین o2 درکمتر از ۲۰ نانو ثانیه جذب غشا شده و به نظر می رسد ایجاد پیوند هیدروژنی در جذب پپتید به غشا

پایان نامه با موضوع مطالعه ی میانکنش پپتید ضد میکروبی سیکلوویولاسین ***o2*** با غشا مدل به کمک شبیه سازی دینامیک مولکولی استاد راهنما دکتر محبوبه ضرابی دانشگاه الزهرا

*۱-استاد یار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران،
(نویسنده مسئول:mzarrabi@alzahra.ac.ir)
۲-دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳-استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه پیام نور اراک، ایران

نقش موثری دارد. در طول زمان شبیه سازی پپتید بر سطح غشا مدل باقی مانده و به درون آن نفوذ نمی کند این در حالیست که حضور پپتید در سطح غشا باعث افزایش بی نظمی در زنجیره های هیدروکربنی می گردد.

واژه های کلیدی : پپتید ضد میکروبی، سیکلوتید، شبیه سازی

مقدمه

سیکلوتید ها یک خانواده ی بزرگ از پروتئین های کوچک هستند، که تقریباً شامل ۳۰ آمینو اسید می باشند و دارای ساختمان گره ای جالب توجه می باشند که به شدت پایدار است و آن ها را در برابر شکست آنزیماتیک، دناتوره کننده های قوی، اسید و حتی جوشیدن مقاوم می کند.(Gran., 1973 a; Saether et al., 1995 ; Colgrare et al. , 2004) به دلیل مقاومت استثنایی و ویژگی های نوید دهنده بیولوژیکی، سیکلوتیدها توجه بسیار زیادی را به خود معطوف ساخته اند و چهارچوب کاری آنها به عنوان یک مدل، برای توسعه ی داروهایی بر پایه پپتید به کار می رود.

سیکلوتیدها تنها خانواده ی شناخته شده از پپتیدهایی هستند که ترکیبی از یک اسکلت حلقوی و یک گره ی سیستئینی می باشند، که با هم به عنوان یک موتیف گره سیستینی حلقوی[1] شناخته می شوند. این موتیف ساختاری، موجب پایداری استثنایی سیکوتیدها شده و این پایداری یک دلیل اصلی برای علاقه به این پپتیدها به عنوان داربست دارویی می باشد.

(Craik et al., 1999; Daly et al., 2009).

سیکلوویولاسین *o2* از گیاه *Viola odorata* (بنفشه ی شیرین) استخراج شده است. این پپتید یک سیکلوتید از زیر خانواده ی bracelet می باشد و دارای توالی زیر است.

GIPCGESCVW IPCISSAIGC SCKSKVCYRN

این پپتید حلقوی دارای ۳ پیوند دی سولفیدی (در موقعیت های ٤-۲۰، ۸-۲۲، ۱۳-۲۷) می باشد.

ساختمان سه بعدی این سیکلوتید بصورت تجربی با روش NMR تعیین شده و در پایگاه PDB دارای کد 2KCG می باشد.

1-Cyclic cystine knot

شکل ۱: ساختمان سه بعدی سیکلوویولاسین o2 (2KCG)

به نظر می رسد که برخی از سیکلوتیدها در شرایط آزمایشی خاص فعالیت ضد میکروبی نشان می دهند، اما این فعالیت لزوماً تحت شرایط نمک بالا که ممکن است در یک سامانه فیزیولوژیکی مشاهده شود، حفظ نمی گردد. به نظر می رسد سیکلوویولاسین o2 در میان فعالترین سیکلوتیدهای با خاصیت ضد میکروبی باشد (Pränting et al., 2010)

ویژگی باکتری کشی بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی، به واسطه ی تشکیل منافذ در دولایه لیپیدی است. هر چند مکانیسم های دیگری از عمل پپتیدهای ضد میکروبی توضیح داده شده است. در مدل Molecular electroporation، پپتیدها میتوانند یک پتانسیل الکترواستاتیک مناسب برای تولید منفذ ایجاد کنند(Shai.,1999) در مدل Sinking float پس از نفوذ پپتید تعادل در دو لایه ی لیپید به هم میخورد. این چنین پپتیدها میتوانند منافذ موقتی تشکیل دهند که برای باکتری کشنده است (Brogden et al., 2003). دیفنسین ها میتوانند لیپو پلی ساکاریدهای باکتریایی را با اتصال به قسمت خاصی از این مولکول غیر فعال کنند. در مدل Canal joining انتقال پپتید در میان دو لایه لیپید بدون تشکیل منفذ انجام می شود. بسیاری از پپتیدها با مهار کردن فرآیندهای درون سلول میکروارگانیسم عمل می کنند. بعضی از پپتیدها سنتز DNA ، بیوسنتز پروتئین یا هر دو فرآیند را مهار میکنند. از آنجایی که هدف تعداد زیادی از پپتیدهای ضد میکروبی از جمله سیکلوتیدها، غشای سلولی است، مطالعه ی میانکش کلی بین بار مثبت پپتید ضد میکروبی و غشاهای باردار با بار منفی باکتریایی و همچنین میانکش های آبگریز پپتیدها با محیط آبگریز غشای باکتری ها متشکل از زنجیره های آسیل جهت طراحی پپتیدهای موثر برای درمان عفونت های باکتریایی بسیار حائز اهمیت می باشد. در این میان، استفاده از شبیه سازی دینامیک

مولکولی می تواند هم در درک مکانیسم فعالیت این پپتیدها و چگونگی فعالیت ضد باکتریایی آن ها و هم پیش بینی مدل هایی که بتواند برای طراحی پپتیدهایی بدون سمیت و با کارایی دارویی بالا بکار رود موثر می باشد. شبیه سازی دینامیک مولکولی بررسی جزئیات لازم در سطح مولکولی و اتمی را برای فهم مکانیسم فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی فراهم می آورد.

روش ها

ساختمان سه بعدی سیکلوویولاسین o2 بصورت تجربی با روش NMR تعیین شده و در پایگاه داده ی PDB دارای کد 2KCG می باشد. بنابراین ساختار اولیه ی سیکلوویولاسین *o2* از پایگاه PDB به آدرس www.rcsb.org/pdb بدست آمد.

فسفاتیدیل اتانول امین و فسفاتیدیل گلیسرول اجزاء اصلی لیپیدی غشاء داخلی باکتری هستند. یک مدل کامپیوتری برای چنین غشایی از پالمیتوئیل فسفاتیدیل اتانول آمین و پالمیتوئیل فسفاتیدیل گلیسرول با نسبت ۳ به ۱ ساخته شده و یون های سدیم برای خنثی کردن بار منفی ناشی از پالمیتوئیل فسفاتیدیل گلیسرول اضافه میگردد.در این پژوهش از یک دو لایه ی لیپیدی مشتمل بر ۱۲۸ مولکول لیپید به عنوان غشاء مدل باکتری های گرم منفی استفاده شد. این غشا شامل ۹۶ مولکول پالمیتوئیل فسفاتیدیل اتانول ، ۳۲ مولکول پالمیتوئیل فسفاتیدیل گلیسرول ، ۳۶۲۳ مولکول آب و ۳۲ مولکول یون سدیم برای خنثی کردن بار منفی ناشی از هر مولکول پالمیتوئیل فسفاتیدیل گلیسرول بود که از قبل به مدت ۱۰ نانو ثانیه متعادل گردیده بود. ساختار pdb لیپید مورد نظر از سایت *http:/ moose.bio.ucalgray.com* بدست آمد. سپس برای افزایش اندازه ی آب در راستای محور z به آن آب اضافه شد. مراحل حداقل رسانی انرژی و متعادل سازی در دو هنگرد nvt و npt انجام شد و مرحله ی تولید به مدت ۳۰ نانو ثانیه انجام گردید.

در مرحله ی پایانی فایل pdb مربوط به سیکلوویولاسین o2 (2KCG)و فایل بدست آمده از شبیه سازی غشا به کمک نرم افزار VMD باز و مشاهده شد. از آنجایی که سیکلوویولاسین o2 در موقعیت مناسبی نسبت به غشا قرار نداشت، موقعیت آن را نسبت به غشا تغییر داده و آن را تقریباً در مرکز و در بالای دو لایه ی لیپیدی و در فاصله ی حدود ٤ نانومتری از مرکز جرم غشا قرار داده و مختصات موقعیت جدید سیکلوویولاسین o2 ذخیره گردید. سیستم دارای دو بار مثبت مربوط به سیکلوویولاسین o2 بود که با اضافه کردن ۲ یون کلر خنثی گردید. به علاوه ٥ یون سدیم و ٥ یون کلر برای نزدیک شدن به شرایط فیزیولوژیک به سیستم اضافه شد.

برای انجام شبیه سازی در مراحل خنثی سازی سیستم و حداقل رسانی انرژی از الگوریتم تندترین کاهش[1] برای انتگرال گیری در ۵۰۰۰۰ مرحله استفاده شد. سپس مرحله تعادل رسانی به کمک هنگرد های nvt و npt با کمک الگوریتم leap-frog جهت انتگرال گیری به اندازه ۵۰۰۰۰ مرحله انجام گرفت. پیکربندی سیستم هر ۰/۲پیکو ثانیه ذخیره شد. مقید سازی بر روی تمام پیوند ها صورت گرفت. مرحله نمونه برداری اصلی با کمک هنگرد npt و به مدت ۲۰ نانو ثانیه انجام گرفت. برای ثابت نگه داشتن دما و فشار سیستم به ترتب در ۳۰۰ کلوین و فشار ۱ بار از ترموستات v-rescale و بارو استات پارنیلو - رحمان استفاده شد. مقید کردن طول پیوندهای شامل اتم هیدروژن با استفاده از الگوریتم lincs انجام گرفت.

برای برهمکنش های بلند برد الکتروستاتیکی به ترتیب از شعاع قطع nm1 و روش PME[2] استفاده شد. انتگرال گیری از معادلات حرکت نیوتنی با استفاده از روش نیم گام جهشی و با گام زمانی ۲ فمتو ثانیه انجام شد. مسیرهای ذخیره شده در شبیه سازی برای تجزیه و تحلیل پارامترهای ساختاری پپتید مورد استفاده قرار گرفت.

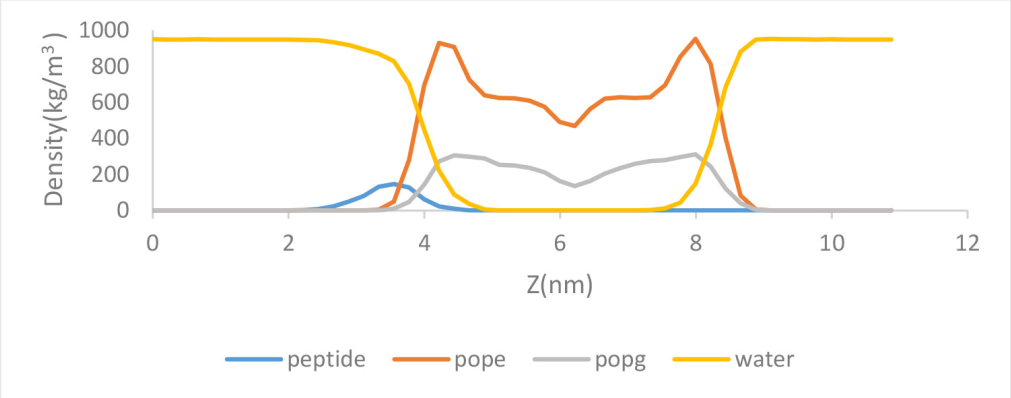
نتایج

شبیه سازی های رایانه ای اطلاعاتی در سطح میکروسکوپی (موقعیت های اتمی و مولکولی، سرعت ها و ...) تولید می کند و تبدیل این اطلاعات بسیار مفصل به مقادیر ماکروسکوپی (فشار، انرژی درونی و ...) مربوط به مکانیک آماری است(جلیلی ،۱۳۸٦). به بیان دیگر مکانیک آماری پل ارتباطی میان خواص ماکروسکوپی و خواص میکروسکوپی است. پس از پایان یک شبیه سازی با انجام آنالیزهای مربوط که از علم مکانیک آماری بهره می گیرد می توان اطلاعات ارزشمندی در خصوص سیستم شبیه سازی شده به دست آورد.

چگالی

چگالی اجزاء مختلف سیستم در راستای محور z جعبه ی شبیه سازی محاسبه شد و نمودار آن رسم گردید. چگالی سیکلوویولاسین $o2$ در راستای نمودار z در سطح غشا افزایش دارد و در بین زنجیره های هیدروکربنی چگالی آن به صفر می رسد. این بدین معناست که سیکلوویولاسین $o2$ وارد زنجیره های هیدروکربنی غشا نشده و بر سطح آن اثر می گذارد(شکل۲)

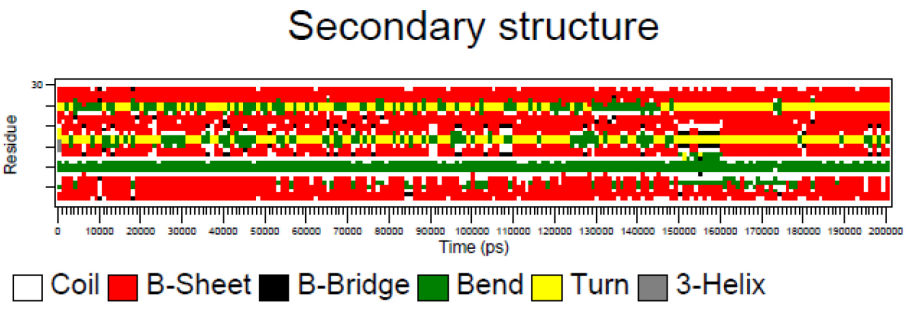
1-Steepest descent
2-Particle Mesh Ewald



شکل ۲: چگالی اجزاء مختلف سیستم در راستای محور z جعبه ی شبیه سازی

تحلیل ساختمان دوم پپتید در طول شبیه سازی

یکی دیگر از قابلیت های نرم افزار گرومکس تحلیل ساختار دوم پروتئین هاست. در واقع پیشگویی ساختار دوم پروتئین، پیش گویی موقعیت ساختاری هر باقی مانده در توالی پروتئین در سه فرم ممکن مارپیچ، رشته و پیچ است. پیش گویی بر اساس این واقعیت است که ساختارهای دوم دارای آرایش منظمی از اسیدهای آمینه می باشند که با الگوهای پیوند هیدروژنی پایدار می شوند. منظم و مرتب بودن ساختار، اساس اصلی الگوریتم های پیش گویی کننده است. در طول ۲۰۰ نانو ثانیه شبیه سازی پپتید در حضور دو لایه ی لیپیدی ساختمان دوم پپتید تغییر چشمگیری نداشت و ساختمان خود را حفظ کرد(شکل۳).



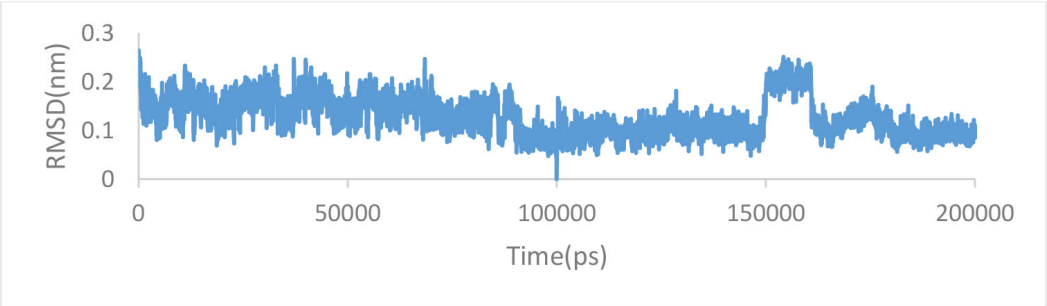
شکل ۳: تغییرات ساختمان دوم پپتید در طول شبیه سازی

جذر میانگین مربع تغییرات در ساختار[1]

میزان جذر میانگین تغییرهر اتم در مولکول از طریق مقایسه با یک ساختار مرجع به عنوان مثال ساختار اولیه آن مولکول قابل محاسبه می باشد. این آنالیز می تواند به عنوان یک معیار برای میزان تغییرات در ساختار پروتئین با توجه به شرایط اعمال شده در طی شبیه سازی مورد استفاده قرار گیرد. این آنالیز می تواند برای تمام اتم های یک پروتئین و یا برای تعدادی از اتم ها به عنوان مثال اتم های تشکیل

1-Root mean square deviation

دهنده ی چارچوب پروتئین انجام پذیرد



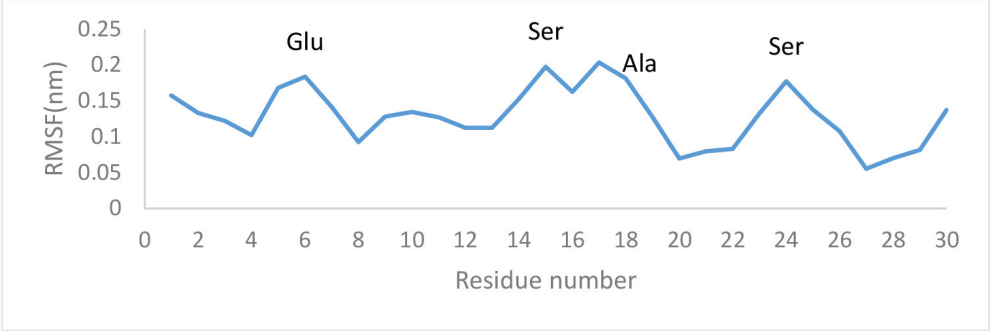
شکل ٤: مقادیر RMSD در برابر زمان برای اتم های کربن آلفای سیکلوویولاسین o2

با توجه به نمودار فوق سیکلوویولاسین *o2* از لحظات آغازین شبیه سازی داری ساختمانی پایدار و متعادل است و این ثبات ساختمانی در تمام مدت شبیه سازی حفظ میگردد.

جذر میانگین مربع نوسانات در ساختار

میزان جذر میانگین مربع نوسانات هر باقی مانده در یک ماکرو مولکول نیز از طریق مقایسه با یک ساختار مرجع به عنوان ساختار اولیه ی آن ماکرومولکول قابل محاسبه می باشد.

(gromacs user manual v 4.5).RMSF معیاری از انعطاف پذیری هر باقی مانده است و عموما برای اتم کربن آلفای هر باقی مانده محاسبه می شود (شکل ٥).

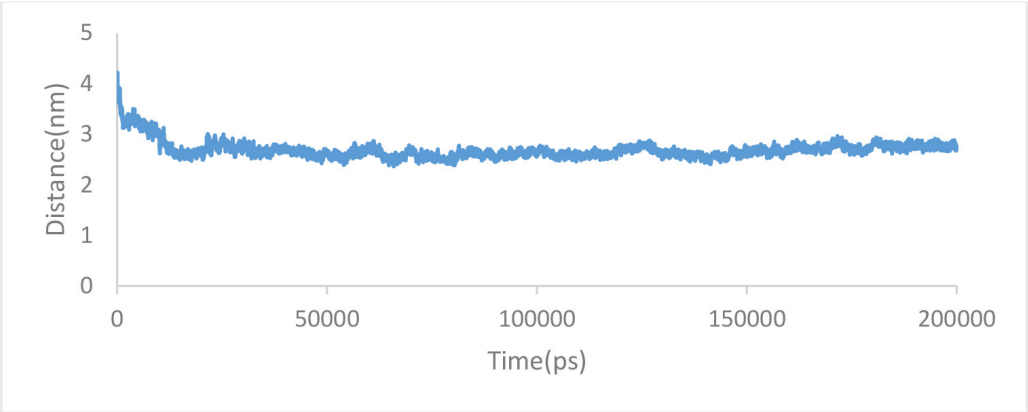


شکل ٥: مقادیر RMSF در برابر زمان اتم های کربن آلفای سیکلوویولاسین o2

با توجه به (شکل ٥) بیشترین میزان انعطاف پذیری مربوط به اسید آمینه های گلوتامیک اسید، سرین و آلانین می باشد که بیانگر اهمیت ویژه ی آن ها در میانکنش با غشاست.

فاصله ی مرکز جرم پپتید از مرکز جرم دو لایه ی لیپیدی در مرحله ی آماده سازی سیستم ترکیبی غشا_ پپتید، سیکلوویولاسین o2 در فاصله ی حدود ٤ نانومتری از مرکز جرم غشا قرار گرفت. در ابتدای شبیه سازی سیکلوویولاسین o2 به سرعت و در کمتر از ۲۰ نانوثانیه در راستای محور *z*پایین آمده و به غشا نزدیک می شود اما در

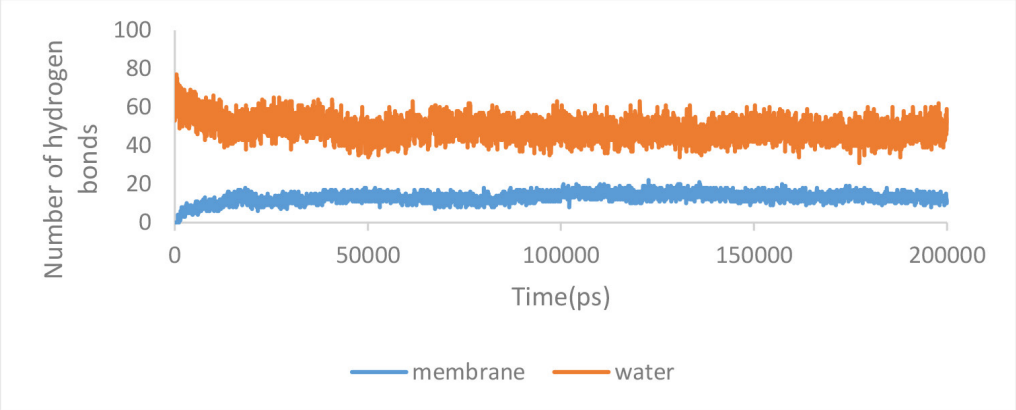
ادامه در سطح باقی مانده و به درون دو لایه ی لیپیدی نفوذ نمی کند(شکل ٦).



شکل٦: فاصله ی مرکز جرم پپتید از مرکز جرم غشا مدل در طول شبیه سازی

پیوند های هیدروژنی

تعداد پیوند های هیدروژنی موجود بین پپتید -آب و پپتید–غشا در طول زمان شبیه سازی محاسبه و نمودار آن رسم شده است. همانطور که در نمودار مشاهده می کنید در لحظات آغازین شبیه سازی تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید-آب کاهش یافته و تعداد پیوند های هیدروژنی بین پپتید وغشا افزایش یافته که این مسئله حاکی از جذب سریع سیکلوویولاسین o2 به غشا مدل باکتری دارد (شکل۷).



شکل۷: تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید–آب وپپتید_غشا در طول زمان شبیه سازی

نظم زنجیره های هیدروکربنی [1]

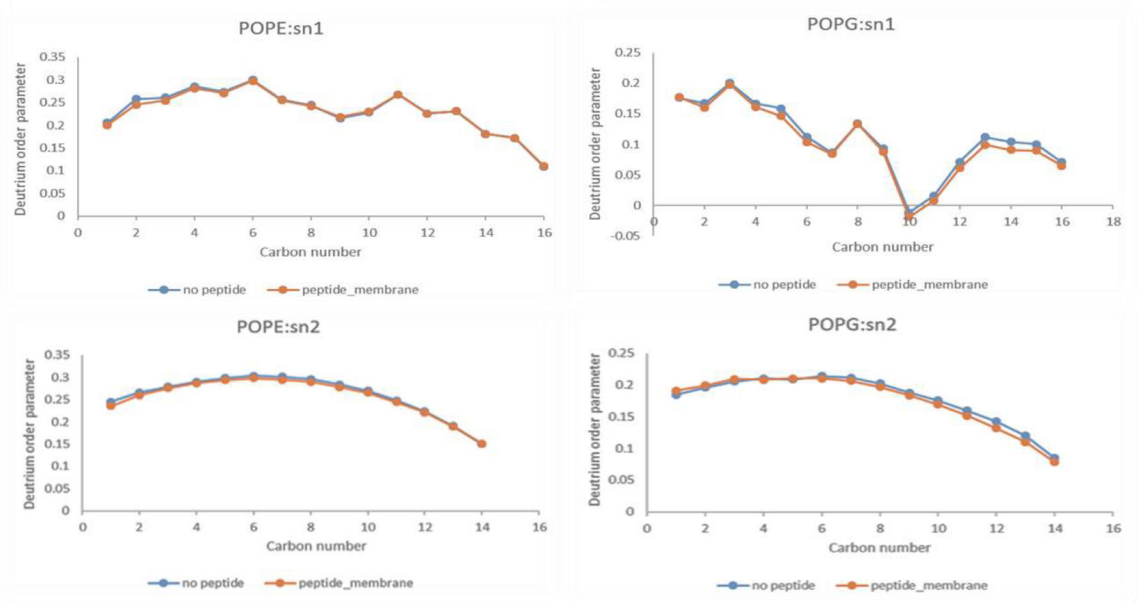
متداولترین کمیت برای توصیف نظم دو لایه ی لیپیدی پارامتر نظم است که می تواند توسط NMR دوتریوم اندازه گیری شود. پارامتر نظم برای هر گروه CH2 در زنجیره ها به صورت زیر تعریف می شود:

که در آن CDθ زاویه ی بین یک پیوند CH (در شبیه سازی) و غشا نرمال است

1-order

Christofer Hofsäß, Erik Lindahl, and) Olle Edholm; 2003) این پارامتر باتعریف فایل ایندکس شامل اتم های کربن موجود در هر زنجیره های هیدروکربنی بطور جداگانه برای غشا مدل باکتری و سیستم ترکیبی پپتید_غشا محاسبه شد.

حضور پپتید باعث کاهش نظم زنجیره های هیدروکربنی POPE (در کربن های ابتدایی زنجیره) و POPG (بویژه در کربن های انتهایی زنجیره) گردیده است (شکل ۸).



شکل ۸: پارامتر order زنجیره های هیدروکربنی POPE و POPG

بحث

با استناد به فعالیت های Lindholm و همکارانش در سال ۲۰۰۲،Herrman و همکارانش در سال ۲۰۰۶و همینطور Pranting و همکارانش در سال۲۰۱۰ سیکلوویولاسین o2 از زیر خانواده ی braclet دارای بیشترین پتانسیل برای تاثیرات سیتوتوکسیک و ضد میکروبی می باشد، بنابراین سیکلوویولاسین o2 جهت مطالعه ی اثر ضد میکروبی به غشا مدل باکتری اضافه شد و اثر آن برای مدت ۲۰۰ نانو ثانیه مورد آنالیز قرار گرفت. با توجه به نتایج و نمودار های حاصله از جمله انحراف جذرمربع میانگین، جذرمربع میانگین افت و خیزهاو تغییرات ساختمان دوم پروتئین ها، در مجموع تمامی آنالیزها و نمودارهای حاصله از شبیه سازی دینامیک مولکولی سیکلوویولاسین o2 به موازات هم و در تائید هم به یک نتیجه رسیدند که تائید پایداری ساختمان این سیکلوتید درشرایط شبیه سازی است.

با توجه به نتایج آزمایشات Robert Burman و همکارانش که در سال ۲۰۱۱ منتشر شد، اندازه و توزیع سطح هیدروفوب، بار خالص مثبت و پتانسیل ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین ملکولی در

سیکلوتیدها همگی فاکتورهایی هستند که در جذب سیکلوتیدها به غشا و تخریب آنها اثر دارند.

بعد از ۲۰۰ نانوثانیه شبیه سازی فاصله ی مرکز جرم پپتید از مرکز جرم دو لایه ی لیپیدی محاسبه و گزارش شد. با توجه به این نمودار و همینطور مشاهده ی فایل مسیر به کمک نرم افزار VMD، سیکلوویولاسین o2 درکمتر از ۲۰ نانوثانیه جذب سطح غشا مدل باکتری گردید. (شکل ۷) که تعداد پیوند های هیدروژنی بین پپتید_آب و پپتید_ غشا را نمایش می دهد تائید می کند که در کمتر از ۲۰ نانو ثانیه از تعداد پیوند های هیدروژنی بین پپتید_آب کاسته و بر تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید_غشا افزوده شده است. بنابراین منطقی به نظر می رسد که ایجاد پیوند های هیدروژنی عامل جذب سیکلوویولاسین o2 به غشا باشد.

Pranting و همکارانش نشان دادند که اثر سیتوتوکسیک سیکلوویولاسین o2 در اثر متیله کردن گلوتامیک اسید ٤٨ بار کاهش یافت.همچنین با توجه به نمودار RMSF که بیانگر انعطاف پذیری بالای اسید آمینه های گلوتامیک اسید، سرین و آلانین نسبت به سایر اسیدهای آمینه می باشد به نظر می رسد که این سه اسید آمینه در میانکنش پپتید_غشا نقش پررنگ تری دارند.

افزایش بی نظمی دم های هیدروکربنی باعث افزایش سیالیت غشا می شوندکه این موضوع روی نقش فیزیولوژیکی سلول باکتری موثر است. با مقایسه مقادیر عددی این پارامتر در شبیه سازی غشا بدون حضور سیکلوویولاسین o2 و در حضور آن، مشاهده شد که حضور پپتید در سطح غشا باعث افزایش بی نظمی در زنجیره های هیدروکربنی می گردد. درتفسیر پدیده ی نامنظم شدن غشایی Tieleman، بیان می داردکه لیپیدهایی که برهمکنش قوی با پپتید ها دارند دچار کج شدگی و نوسان بیشتری نسبت به دو لایه های طبیعی می شوند بنابراین می توان نتیجه گرفت که سیکلوویولاسین o2 بر غشا مدل اثر میگذارد و منجر به افزایش بی نظمی در آن می شود اما حداقل با نسبت شبیه سازی شده و در مدت ۲۰۰ نانوثانیه شبیه سازی وارد غشا نشده و بر سطح غشا اثر می گذاردکه با این وجود سه فرضیه مطرح میشود:

۱-ممکن است با ادامه ی شبیه سازی به مدت طولانی تر سیکلوویولاسین o2 وارد غشا گردد.

۲- ممکن است مشابه پروژه انجام شده توسط Jianguo Li و همکارانش افزایش تعداد سیکلوویولاسین o2 باعث تجمع و ایجاد منفذ گردد.

۳- ممکن است سیکلوویولاسین o2 با مکانیسم دیگری غیر از ایجاد منفذ باعث مرگ سلول باکتری گردد.

حصـول نتایـج دقیـق تـر منـوط بـه ادامـه ی شـبیه سـازی بـرای زمـان هـای طولانـی تـر اسـت امـا آنچـه از آنالیزهـای انجـام شـده در ایـن پژوهـش قابـل اسـتنتاج اسـت بـه شـرح زیـر مـی باشـد:

۱- سـاختمان سیکلوویولاسـین o2 در طـول شـبیه سـازی و بـا نزدیـک شـدن بـه غشـا تغییـر نکـرده و پایـدار باقـی مـی مانـد.

۲- ایجـاد پیونـد هیدروژنـی بیـن پپتید_غشـا نقـش موثـری در جـذب سیکلوویولاسـین *o2* بـه غشـا دارد.

۳- در مـدت ۲۰۰ نانوثانیـه حضـور سیکلوویولاسـین o2 بـر سـطح غشـا بـی نظمـی زنجیـره هـای هیدروکربنـی غشـا افزایـش مـی یابـد کـه خـود افزایـش سـیالیت غشـا را در پـی دارد.

٤- آمینـه هـای گلوتامیـک اسـید، سـرین و آلانیـن در میانکنـش پپتید_غشـا نقـش پررنـگ تـری دارنـد.

منابع

جلیلـی، س. (۱۳۸٦) شـبیه سـازی هـای یارانـه ای (دینامیـک مولکولـی و مونـت کارلـو)، تهـران، انتشـارات دانشـگاه خواجـه نصیرالدیـن طوسـی، صفحـه ۱۲۰ - ۱.

روشـن، ا. (۱۳۹۱) شناسـایی ژن سـیکلوتید در یکـی از گونـه هـای بنفشـه در ایـران و آنالیـز بیوانفورماتیکـی توالـی ژن و پروتئیـن آن، پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد، دانشـگاه الزهـرا، تهـران

Burman, R., Stromstedt, AA., Malmsten, M. and Goransson, U. (2011) Cyclotide-membrane interaction : Defining factors of membrane binding,depletion and disruption,Biochimica et Biophysica Acta 1808: 2665-2673.

Colgrave, M.L., and Craik, D.J. (2004) Thermal, chemical and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. Biochemistry 43: 5965-5975.

Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., and Waine, C. (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. Molecular Biology 294(5): 1327-36

Gran, L. (1973a) Oxytocic principles of Oldenlandia affinis. Lloydia 36: 174-178.

Jianguo, L., Shouping, L., Rajamani, L., Yang, B., Konstantin, P., Chandra, V., Roger W. B (2013) Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 1828:1112-1121.

Pranting, M., Loov, C., Burman, R., Goransson, U. and I. Andersson, D. (2010) The cyclotide cycloviolacin O2 from Viola odorata has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria, Journal Antimicrob Chemotherapy 65: 1964–1971

Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J. and Norman, D.G. (1995) Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. Biochemistry 34(13): 4147-4158

Tieleman, D., Forrest, L., Sansom, M., Berendsen, H. (1998) Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, influenza M2, and alamethicin systems: molecular dynamics simulations. Biochemistry 1998 37(50): 17554-61.