

Bioinformatics Evaluation of Plant Cyclic Peptides for Identifying the Most Efficient Peptide for Recombinant Drug Production

Bahareh Kamalian¹, Fatemeh Rejei², Mojtaba Ranjbar^{3*}

1. Biotechnology Department, Faculty of Biotechnology, University of Advanced Technologies (baharekamaliann@gmail.com).

2. Bachelor, Microbial Biotechnology Department, Faculty of Biotechnology, University of Advanced Technologies (ft.rejaei@ausmt.ac.ir).

3. Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Biotechnology, University of Advanced Technologies (Corresponding Author; ranjbarf@ausmt.ac.ir).

Article history:

Received:09/01/2025 Revised:23/01/2025 Accepted:29/01/2025

Abstract

Introduction: Cancer is one of the life-threatening diseases worldwide. The conventional treatments of cancer include chemotherapy and radiotherapy; both have serious side effects. Plant cyclic peptides have been suggested to act as potent anticancer agents with high biological activity and structural stability.

Methods: This present study conducted some bioinformatics analyses on plant cyclic peptides' physicochemical, structural, and evolutionary properties. Data were extracted from the NCBI database and analyzed using the bioinformatics tools ProtParam, Psipred, and Mega6.

Results: The analyses indicated that the studied cyclic peptides were highly stable structurally, as the instability indices were below 40. Phylogenetic analyses showed that the cyclic peptide identified from the *Clitoria ternatea* species, due to its desirable biological activity, is likely the best candidate for use

Conclusion: It follows that, because of their stability and other characteristics, cyclic peptides are a great candidate for the development of anti-cancer drugs. Therefore, genetic engineering should give priority to AEK26412.1 as one suitable option for the production of recombinant peptides, taking into consideration all the favorable physicochemical and structural properties of this peptide.

Keywords: Plant cyclic peptides, cyclotide, instability index, cancer, biological activity.

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی

سال سوم / شماره ۵ / زمستان ۱۴۰۳

صص: ۲۶-۵

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۳/۱۰/۲۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

ارزیابی بیوانفورماتیکی پپتیدهای سیکلوتیدی گیاهی جهت شناسایی کارآمدترین پپتید برای تولید داروی نو ترکیب

بهاره کمالیان^۱، فاطمه رجائی^۲، مجتبی رنجبر^{۳*}

۱. گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین
(baharekamaliann@gmail.com).

۲. کارشناسی، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های
نوین (ft.rejaei@ausmt.ac.ir).

۳. دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین
(نویسنده مسئول؛ ranjbarf@ausmt.ac.ir).

چکیده

مقدمه: سرطان یکی از بیماری‌های تهدیدکننده حیات در سراسر جهان است. روش‌های درمانی مرسوم سرطان شامل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است که هر دو با عوارض جانبی جدی همراه هستند. پپتیدهای حلقوی گیاهی به‌عنوان عوامل ضدسرطانی قوی با فعالیت زیستی بالا و پایداری ساختاری مناسب مطرح شده‌اند.

روش‌ها: در این مطالعه، تحلیل‌های بیوانفورماتیکی برای بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و تکاملی پپتیدهای حلقوی گیاهی انجام شد. داده‌ها از پایگاه NCBI استخراج و با ابزارهای بیوانفورماتیکی Psipred، ProtParam و Mega6 تحلیل شدند.

نتایج: تحلیل‌ها نشان داد که سیکلوتیدهای مورد مطالعه از نظر ساختاری بسیار پایدار

بوده و شاخص ناپایداری آنها کمتر از ۴۰ است. تحلیل‌های فیلوژنتیکی نشان داد که سیکلوتید شناسایی شده از گونه *Clitoria ternatea* به دلیل فعالیت زیستی مطلوب، احتمالاً بهترین گزینه برای استفاده است.

نتیجه‌گیری: به دلیل پایداری و سایر ویژگی‌های منحصر به فرد، سیکلوتیدها کاندیدای بسیار قوی برای توسعه داروهای ضدسرطانی هستند. توالی AEK26412.1 به عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید پپتید نو ترکیب در مهندسی ژنتیک، به دلیل ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و ساختاری مطلوب پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: پپتیدهای حلقوی گیاهی، سیکلوتید، شاخص ناپایداری، ضد سرطان، فعالیت بیولوژیکی

۱. مقدمه

سرطان در سراسر جهان به عنوان یک بیماری کشنده در نظر گرفته می‌شود. علت آن رشد غیرطبیعی سلول‌های بدن با توانایی متاستاز است. این بیماری چند عاملی است و عواملی مانند ساختار جمعیت، سبک زندگی و ژنتیک از جمله عوامل مؤثر در توسعه و پیشرفت آن گزارش شده است. کیفیت زندگی بیماران تحت تأثیر عوارض جانبی عمده درمان‌ها از جمله عوارض پس از جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی است [1]. با این حال، بسیاری از این گزینه‌های درمانی موجود فاقد انتخاب‌پذیری هستند، که باعث عوارض جانبی مانند اثر سمی بر سلول‌های طبیعی و آسیب به بافت‌های اطراف می‌شود [2]. امروزه تحقیقات حوزه کشف و توسعه داروی جدید ضد سرطانی، پپتیدهای حلقوی را به عنوان عوامل ضد سرطان مطرح کرده است. پپتیدهای حلقوی با نوعی ترکیب زنجیره پلی پپتیدی، حاوی یک توالی دایره‌ای (حلقه‌ای) از پیوندها هستند و به دلیل خواص دارویی خود شناخته شده‌اند. پپتیدهای حلقوی به علت مزایایی همچون میل پیوندی خوب، انتخاب هدف و سمیت کم به کاندید دارویی و یک روش درمانی جذاب تبدیل می‌شوند [3]. علاوه بر این، پپتیدهای حلقوی به راحتی توسط آنزیم‌های پروتئاز شناسایی نمی‌شوند. بنابراین، آن‌ها پایداری بهتری نسبت به همتای خطی خود

دارند [4]. همچنین برای استفاده در برابر اهداف خارج سلولی مناسب هستند. همین مزایا استفاده از پپتیدهای حلقوی را به عنوان کاندید دارویی، منحصر به فرد می‌کند. [5] مطالعات متعددی فعالیت ضد سرطانی پپتیدهای حلقوی را علیه سرطان سینه [6]، سرطان ریه [7] و سرطان مغز [8] و غیره گزارش کرده‌اند [2]. سیکلوتیدها به عنوان یک پپتید حلقوی، خانواده‌ای از پروتئین‌های دفاعی گیاهی هستند که به دلیل پایداری بالای ساختار CCK (توالی با پنج آمینواسید که انتهای کربوکسیل مشابه با گاسترین دارد)، در برابر تخریب پروتئولیتیک، شیمیایی و حرارتی مقاوم هستند. بنابراین به عنوان الگوهای امیدوارکننده‌ای برای طراحی داروهای زیست فعال جدید مبتنی بر پپتید با طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و مولتیپل اسکلروزیس به دلیل پایداری بالای آن‌ها در شرایط مختلف بیولوژیکی شناخته شده‌اند [9] و [10]. فعل و انفعالات سیکلوتید-غشاء با سمیت سلولی مشاهده شده مرتبط است به این صورت که ابتدا ترکیب زیست فعال اتصال اولیه غشاء و جاگیری پپتید را در سطح غشاء تسهیل می‌کند و برهمکنش‌های بعدی بین باقی مانده‌های آگریز و هسته غشاء باعث وارد شدن سیکلوتید به غشاء می‌شود. قرار دادن سیکلوتیدها باعث ایجاد اختلالات موضعی در دولایه لیپیدی می‌شود که باعث از هم گسیختگی غشاء و در نتیجه منجر به مرگ سلولی می‌شود. بنابراین نشان می‌دهد که نفوذپذیری و تجزیه غشاء زیربنای سمیت سلولی سیکلوتید است که به دلیل کاربردهای بالقوه ضد سرطانی مورد توجه است. فراوان ترین سیکلوتید موجود در گیاه *Hybanthus enneaspermus*، Hyen D، دارای فعالیت ضد سرطانی قابل مقایسه با سیکلوپولاسین O2، یکی از سیتوتوکسیک‌ترین سیکلوتیدهای شناخته شده بود. با استفاده از تصویربرداری سلول زنده، نشان داده شد که Hyen D باعث ایجاد حباب سریع غشاء و نکروز سلولی می‌شود. در طول دو دهه گذشته، در تحقیقات متعددی تولید نسخه سنتزی و مهندسی شده از توالی سیکلوتیدهای طبیعی، به ویژه کالاتا B1 و MCOTI-II گزارش شده است. به دلیل اندازه‌های نسبتاً کوچک، سیکلوتیدها می‌توانند به صورت شیمیایی با روش‌های سنتز پپتید فاز جامد استاندارد (SPPS) تولید می‌شود. با این حال، این رویکرد علاوه بر ایجاد اثرات منفی بر محیط زیست توسط تولید زباله‌های بزرگ، شامل معرف‌های پرهزینه نیز

می‌شود. بنابراین تولید نوترکیب سیکلوتیدها در سیستم‌های بیانی موفقیت‌آمیز است و توصیه شده است و همچنین می‌تواند با بیان هترولوگ در انواع مختلف سلول‌ها با استفاده از وکتورهای بیان استاندارد تولید شود. میزبان بیانی گیاهی برای تولید پروتئین‌های درمانی از جمله سیکلوتیدهای نوترکیب یک پلت فرم جذاب است زیرا آن‌ها گزینه‌های ایمن تری نسبت به سیستم‌های سنتی کشت سلولی میکروبی و پستانداران هستند. [11] ویژگی سیکلوتیدها این است که برخی از آن‌ها می‌توانند از طریق مکانیسم‌های اندوسیتی از غشای سلولی سلول‌های پستانداران عبور کنند و قادر به تعدیل PPI در شرایط *in vitro* و *in vivo* باشند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که جذب MCoTI-I/II در سلول‌های انسانی از طریق اندوسیتوز اتفاق می‌افتد و بار مثبت کلی پپتید برای درونی‌سازی کارآمد مهم است. سیکلوتیدهایی مانند کالاتا B127 و مهارکننده‌های تریپسین *Momordica cochinchinensis* I و *MCoTI-I/II* II می‌توانند توسط سلول‌های پستانداران درونی شوند که به‌عنوان پپتیدهای نفوذی به سلول حلقوی (CCPPs) طبقه‌بندی شده‌اند. این ویژگی‌ها سیکلوتید را به یک چارچوب مولکولی ایده‌آل برای تولید عوامل تشخیصی و درمانی جدید مبتنی بر پپتید با استفاده از مهندسی مولکولی ویا استراتژی‌های تکامل تبدیل کرده‌است [2].

به همین جهت برای تولید سیکلوتید با خاصیت بیولوژیکی بالا توسط میزبان‌های مختلف در مهندسی ژنتیک عوامل زیادی نقش دارد که طی آن باید ویژگی‌های ساختاری، تکاملی و فیزیکوشیمیایی سیکلوتید مورد نظر بررسی شود. هدف از این مطالعه آنالیزهای بیوانفورماتیکی سیکلوتیدهای مختلف به جهت بررسی روابط تکاملی، ساختار دوم، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و تعیین حضور یا عدم حضور پیوند دی‌سولفیدی در گونه‌های گیاهی *Viola baoshanensi*, *Viola tricolor*, *Chassalia* *Melicytus ramiflorus* و *odorata Clitoria ternatea*, *Viola chrtac*, می‌باشد.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

سیکلوتیدها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پپتیدهای حلقوی هستند که در گیاهان به روش ریبوزومی سنتز می‌شوند. این پپتیدها ساختار سه‌بعدی منحصر به فردی دارند که

باعث شده از پایداری فوق‌العاده‌ای برخوردار باشند. همین ویژگی، سیکلوتیدها را به گزینه‌ای بسیار جذاب برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی تبدیل کرده است. عملکرد اصلی این پپتیدها در گیاه، محافظت در برابر حشرات و عوامل بیماری‌زاست. اخیراً از این ویژگی طبیعی برای تولید محصولات کشاورزی مانند Sero-X، که اولین آفت‌کش زیستی بر پایه عصاره گیاهی حاوی سیکلوتید است، استفاده شده است [11].

اما کاربرد سیکلوتیدها تنها به کشاورزی محدود نمی‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که این پپتیدها پتانسیل بالایی برای استفاده در درمان‌های زیستی دارند. به‌طور خاص، سیکلوتیدها سه زیر خانواده مهارکننده تریپسین^۱، موبیوس^۲ و برسلت^۳ طبقه تقسیم می‌شوند. از این میان، زیرخانواده برسلت بیشترین تعداد سیکلوتیدها را شامل می‌شود و دو سوم کل خانواده را تشکیل می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند که سیکلوتیدهای برسلت در مقایسه با موبیوس، خواص زیستی قوی‌تری دارند و همین موضوع باعث شده آن‌ها به گزینه‌های امیدوارکننده‌تری برای تحقیقات آینده تبدیل شوند. برای مثال، یک تحقیق نشان داده است که سیکلوتید cyO2 از زیرخانواده برسلت، در مقایسه با دو سیکلوتید موبیوس (varv A و varv F)، بیش از ۲۰ برابر قدرت سمیت سلولی بیشتری بر سلول‌های سرطانی دارد [12].

همچنین، در مطالعه دیگری مشخص شد که سه سیکلوتید برسلت (vitri A، vitri F و vitri F) ده برابر بیشتر از ۱۱ سیکلوتید موبیوس علیه پنج رده سلولی سرطانی فعال بودند [13]. این نتایج نشان می‌دهند که سیکلوتیدها با اتصال به غشاء سلولی، فعالیت‌هایی مانند سمیت سلولی، ضد انگل، حشره‌کشی، و حتی ضد تروروپروسی را انجام می‌دهند [14]، [15]، [16]، [17].

اولین سیکلوتید از زیرخانواده برسلت، کالاتا B1، به‌عنوان ماده‌ای فعال در چای دارویی گیاه *Oldenlandia affinis* برای درمان انقباضات رحمی کشف شد. از آن زمان تاکنون، صدها سیکلوتید در خانواده‌های مختلف گیاهی مانند Rubiaceae، Violaceae،

۱. trypsin inhibitor

۲. Möbius

۳. bracelet

Solanaceae, Fabaceae و Poaceae شناسایی شده‌اند. این پپتیدها در بخش‌های مختلف گیاه از جمله ریشه، ساقه، و برگ یافت می‌شوند، اما غلظت آن‌ها در دانه‌ها بسیار کم است [11].

یکی از جنبه‌های جذاب سیکلوتیدها، مقاومت بالای آن‌ها در برابر تخریب‌های پروتئولیتیک و شرایط محیطی سخت است. مطالعات نشان داده‌اند که جهش‌هایی مانند جایگزینی آلانین در سیکلوتیدها می‌تواند به افزایش مقاومت آن‌ها در برابر هضم آنزیمی و هیدرولیز اسیدی کمک کند. برای مثال، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که مشابه شرایط معده انسان است، سیکلوتید کالاتا B1 و جهش‌یافته‌های آن بسیار پایدار باقی ماندند. حتی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، پایداری آن‌ها در مقایسه با پپتیدهای خطی کنترل، بسیار بیشتر بود [18]. اولین گزارش از یک اسکن جهش‌زایی است که بر روی یک سیکلوتید برسلت انجام شده است، بینش‌هایی را در مورد عملکرد آن‌ها ارائه می‌دهد و از تلاش‌های آینده برای مهندسی سیکلوتیدهای برسلت برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی پشتیبانی می‌کند [11]. مطالعات نشان داده‌اند که سیکلوتیدها در برابر تخریب ناشی از آنزیم‌های اندوپروتئاز و اگزوپروتئاز مقاومت بالایی دارند. به‌عنوان مثال، سیکلوتیدهای بازدارنده تریپسین (MCoTI-I & MCoTI-II) -I/II- که از گیاه *Momordica cochinchinensis* استخراج شده‌اند، و همچنین مهارکننده تریپسین SFTI-1 از آفتابگردان، توسط آنزیم آسپاراژین اندوپپتیداز پردازش می‌شوند. این فرآیند منجر به تشکیل ستون فقراتی متصل از سر به دم می‌شود که به پایداری ساختاری این پپتیدها کمک می‌کند. با این حال، این ترکیبات توانایی مهار مستقیم تریپسین یا کیموتریپسین را ندارند و احتمالاً علاوه بر چرخه‌سازی ترمینال C، در پردازش ترمینال N نیز نقش ایفا می‌کنند. قابل ذکر است که SFTI-1 یکی از قوی‌ترین مهارکننده‌های تریپسین بومن-بیرک است که به‌طور طبیعی وجود دارد. [14]

در مطالعه دیگری، یک باقیمانده حفاظت‌شده گلوتامات (Glu) نقش کلیدی در تنظیم فعالیت سیکلوتیدها ایفا می‌کند. این یافته توضیح می‌دهد که چگونه سیکلوتیدها می‌توانند در محیط‌های نامساعد مانند روده حشرات شکارچی فعالیت خود را حفظ کنند. همچنین، این تحقیق چارچوبی ساختاری را پیشنهاد می‌کند که نشان می‌دهد

چگونه باقی مانده‌های مهم برای زیست‌فعالی، در برهم‌کنش‌های غشایی نقش دارند. ساختار مقاوم و پایدار سیکلوتیدها نه تنها برای فعالیت زیستی آن‌ها ضروری است، بلکه آن‌ها را به یک الگوی مناسب برای طراحی داروهای مبتنی بر پپتید تبدیل کرده است. این ویژگی‌ها سیکلوتیدها را به یکی از بهترین گزینه‌ها برای استفاده در تحقیقات بیوتکنولوژیکی و توسعه درمان‌های جدید تبدیل کرده‌اند [15].

۳. مواد و روش

توالی‌های نوکلئوتیدی سیکلوتیدها از پایگاه نوکلئوتیدی بانک اطلاعاتی NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) استخراج شد و از بخش protein-id توالی پروتئینی به فرمت FASTA بدست آمد و ذخیره شد. شناسایی دامین‌های حفاظت شده عملکردی این پروتئین‌ها توسط پایگاه داده دامین‌های حفاظت شده بانک اطلاعاتی NCBI (CDD) (ncbi.nlm.nih.gov/cdd/) انجام شد.

برای بررسی وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در توالی آمینواسیدی مورد مطالعه و همچنین محل هدف سیکلوتیدها از ابزارهای SignalP6 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) و DeepLoc2.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.1/>) استفاده شد [19], [20].

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی سیکلوتیدها نظیر وزن مولکولی، تعداد آمینواسیدها، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک و شاخص ناپایداری از نرم‌افزار ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) بدست آمد. [21] ساختار دوم توالی‌های پروتئینی توسط سرور Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) [22] و Sopma (http://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) [23] پیش‌بینی شد. احتمال حضور یا عدم حضور پیوندهای دی سولفیدی در سیکلوتید با استفاده از نرم‌افزار Softberry (http://www.softberry.com/cys_rec&group) مشخص شد.

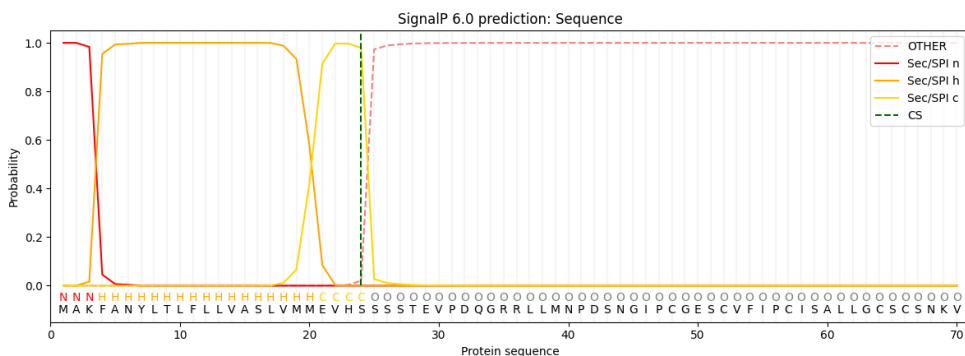
درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار به منظور شناسایی شباهت‌ها و تفاوت‌های تکاملی توالی‌ها و تعیین گروه‌بندی‌های MEGA6 رسم شد. [24] سپس روابط توالی‌ها با

بررسی فاصله ژنتیکی آن‌ها نسبت به یکدیگر بررسی شد. ژنتیکی هم ردیفی توالی‌های پروتئین‌های سیکلوتیدها و بررسی جایگزینی آمینواسیدها با توالی‌های خویشاوندی نزدیک توسط نرم‌افزار MegaAlign جهت بررسی تغییرات خواصشان مورد بررسی قرار گرفت.

۴. نتایج

۱۹ توالی پروتئینی سیکلوتید با توجه به وجود دمین حفاظتی با بررسی توالی‌ها با استفاده از Conserve domain در NCBI و همچنین با توجه به خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها مثل شاخص پایداری انتخاب شدند. پیش‌بینی دمین‌های عملکردی نشان داد که اغلب سیکلوتید مورد مطالعه دارای دمینی به نام Cyclootide با شماره دسترسی Pfam03784 می‌باشد. در گونه گیاهی *Clitoria ternatea* علاوه بر خانواده سیکلوتیدی، دمینی با نام، Albumin_I_a و شماره دسترسی (Pfam16720) یافت می‌شود.

نتایج پیش‌بینی توالی سیگنال پپتید نشان داد که سیکلوتیدهای مورد مطالعه سیگنال پپتید ترشحی در سمت انتهای آمینی توالی آمینواسیدی خود دارند (شکل ۱). همچنین با هدایت توسط سیگنال پپتیدهای ترشحی به ناحیه خارج سلولی منتقل می‌شوند که با عملکرد آن‌ها مطابقت دارد.



شکل ۱. نتیجه پیش‌بینی سیگنال پپتید سیکلوتید

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی سیکلوتیدها نشان می‌دهد که تعداد آمینواسیدها ۷۷ تا ۱۹۸، جرم مولکولی ۸۵۰۲،۱۳ تا ۲۰۸۹۵،۴۷ است. پایدارترین پروتئین ABO21630.1، با شاخص ناپایداری ۱۷،۱۹ در گونه گیاهی *Melicytus ramifloru* یافت می‌شود. شاخص آلیفاتیک ۷۹،۴۳ تا ۱۱۰،۶۷، نقطه ایزوالکتریک ۵،۷۲ تا ۸،۳۱ است و GRAVY ۰،۱۶۴ تا ۰،۵۴۲ است و در توالی AEK26403.1 با مقدار Gravy -۰،۰۶۹ آب گریزترین توالی است. محاسبه بار خالص سیکلوتیدها نشان داد که اغلب آنها دارای بار منفی‌اند. اما در گونه *Clitoria ternatea* علاوه بر بار منفی بار مثبت مشاهده شد و در اغلب گونه‌ها به جز *Clitoria ternatea* دارای بار خنثی بودند (جدول ۱).

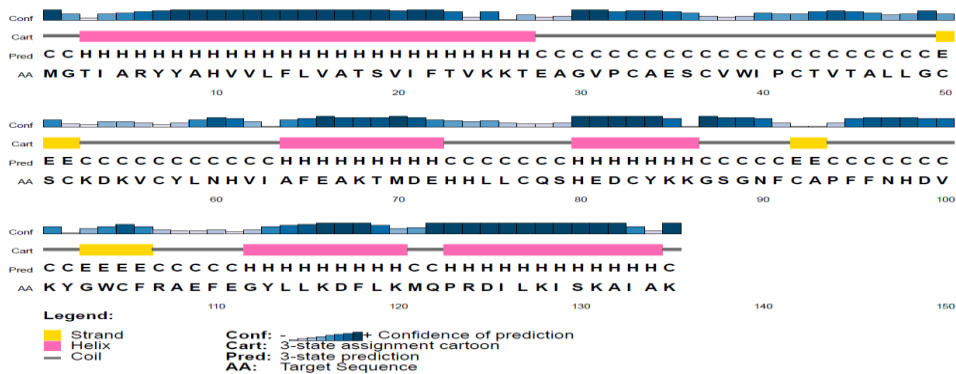
جدول ۱. بررسی خواص فیزیکوشیمیایی سیکلوتیدها

Plant	Protein name	Protein id	Length	Mw(KDa)	pI	(Arg+Lys)	(Asp+Glu)	Aliphatic index	Instability index	GRAVY
<i>Viola odorata</i>	Cyclotides	AAU04392.1	118	12403.58	6.05	8	9	105.00	22.51	0.492
	Cyclotides	AAU04393.1	118	12476.6312438.6	6.056.21	8	9	103.31	21.59	0.426
	Cyclotides	AAU04394.1	115	9		11	11	109.48	34.70	0.388
<i>Melicytus ramiflorus</i>	Cyclotides	ABO21629.1	19810	20895.4710447.2	5.736.68	15	17	113.28	29.20	0.407
	Cyclotides	ABO21630.1	0	8		8	8	100.50	17.19	0.476
<i>Clitoria ternatea</i>	Cyclotides	AEK26405.1	12312	13529.7713354.5	6.176.166.925.87 8.315.725.28	11	13	79.43	30.38	0.224
	Cyclotides	AEK26408.1	2	4		9	11	84.75	24.97	0.404
	Cyclotides	AEK26407.1	13011	14255.6812896.0		13	13	86.31	24.32	0.276
	Cyclotides	AEK26409.1	7	2		8	11	85.04	30.20	0.418
	Cyclotides	AEK26412.1	13512	15267.95		16	13	84.52	22.88	0.164
	Cyclotides	QMV80766.1	7	14278.5114908.2		10	13	86.85	29.66	0.228-
	Cyclotides	AEK26403.1	132	9		14	14	68.71	36.38	0.062
<i>Chassalia chartace</i>	Cyclotides	AFH57352.1	77	8502.13	6.057.58	6	6	102.60	28.64	0.041
	Cyclotides	AFH57365.1	78	8464.88		6	5	87.44	36.10	0.246
<i>Viola tricolor</i>	Cyclotides	ALI30822.1	11911	12573.77	6.536.06	9	9	110.67	31.88	0.485
	Cyclotides	ALI30827.1	9	12770.00		9	10	113.11	29.01	0.400
	Cyclotides	ALI30823.1	114	12262.58	6.06	10	11	107.02	29.28	0.542
<i>Viola Baoshanensis</i>	Cyclotides	ACG69852.1	115	12438.69	6.217.31	11	11	109.39	33.96	0.387
	Cyclotides	ACG69861.1	207	21378.83		15	14	79.66	39.55	0.216

در بررسی ساختار دوم سیکلوتیدها، محدوده Alpha helix $28.50\% - 51.26\%$ است. Extended strand در محدوده $7.66\% - 24.05\%$ ، turn Beta در محدوده $0.87\% - 10.63\%$ و Random coil در محدوده $33.00\% - 50.76\%$ است. باتوجه به نتایج بیشترین میزان در توالی ALI30827.1 در گونه گیاهی *Viola tricolor* است (شکل ۳).

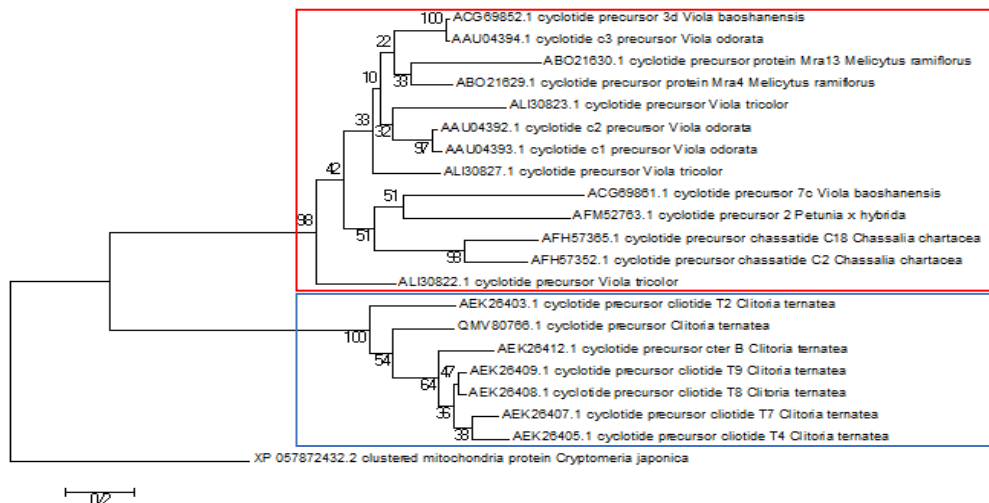
جدول ۲. آنالیز ساختار دوم سیکلوتیدها

plant species	Protein. id	Alpha helix (%)	Extended strand(%)	Beta turn(%)	Random coil (%)
<i>Viola odorata</i>	AAU04392.1	45.79%	7.66%	2.54%	44.07%
	AAU04393.1	50%	12.71%	3.39%	33.90%
	AAU04394.1	49.57%	7.83%	0.87%	41.74%
<i>Melicytus ramiflorus</i>	ABO21629.1	37.88%	12.63%	5.56%	43.94%
	ABO21630.1	45.00%	14.00%	8.00%	33.00%
<i>Clitoria Ternatea</i>	AEK26405.1	31.71%	21.14%	2.88%	42.28%
	AEK26407.1	40.77%	18.46%	6.15%	34.62%
	AEK26408.1	42.62%	13.93%	2.46%	40.98%
	AEK26409.1	37.61%	17.09%	2.56%	42.72%
	AEK26412.1	40.00%	15.30%	5.19%	38.52%
	QMV80766.1	37.01%	8.66%	7.09%	47.24%
	AEK26403.1	34.09%	20.45%	5.30%	40.15%
<i>Chassalia chartace</i>	AFH57352.1	29.87%	19.48%	3.90%	46.75%
	AFH57365.1	34.62%	20.51%	3.85%	41.03%
<i>Viola tricolor</i>	ALI30822.1	49.58%	10.92%	3.36%	36.13%
	ALI30827.1	51.26%	9.24%	3.36%	36.13%
	ALI30823.1	50.00%	7.89%	5.26%	36.84%
<i>Viola Baoshanensis</i>	ACG69852.1	37.39%	12.17%	4.35%	46.09%
	ACG69861.1	28.50%	10.14%	10.63%	50.76%



شکل ۲. پیش‌بینی ساختار دوم توسط نرم‌افزار PSIPRED

درخت فیلوژنتیکی جهت بررسی روابط ژنتیکی توالی‌های سیکلوئید رسم شد. نتایج نشان می‌دهد که سیکلوئیدهای مورد مطالعه به دو کلاستر و گروه اصلی تقسیم می‌شوند که سیکلوئیدهای گیاه *Clitoria ternatea* در یک گروه با بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد قرار دارند که همگی با هم شباهت دارند. کلاستر دوم با بوت‌استرپ ۹۸ درصد خود باقی سیکلوئیدها را شامل می‌شود. در زیر کلاستر گروه B سیکلوئیدهایی با شماره دسترسی (ACG69852.1 و AAU04394.1) با بوت‌استرپ ۱۰۰، (AAU04392.1 و AAU04392.1) و (AAU04393.1 با بوت‌استرپ ۹۷، (AFH57352.1 و AFH57365.1) با بوت‌استرپ ۹۸ شباهت دارند (شکل ۳).



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی سیکلوئیدها در گیاهان مختلف

با توجه به شکل ۵ نتایج حاصل از Distance نشان داد که سیکلوتیدهای یک گیاه کمترین فاصله ژنتیکی را دارند. سیکلوتیدهای با شماره دسترسی (ACG69852.1 و AAU04394.1 و بعداً ((AAU04392.1 و AAU04393.1)) و AEK26409.1 و AEK26408.1)) و AEK26407.1 و AEK26408.1 کمترین فاصله ژنتیکی را در بین پپتیدهای مطالعه حاضر دارند که نشان دهنده بیشترین شباهت بین توالی‌ها می‌باشد. این بررسی تایید کننده Bootstrap درخت فیلوژنی می‌باشد(شکل ۴).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1. ACG69852.1 cytochrome precursor 7c Viola baoshanensis																						
2. ACG69852.1 cytochrome precursor 3d Viola baoshanensis	1,001																					
3. QM180766.1 cytochrome precursor Clitoria ternatea	1/946	2/100																				
4. AEK26409.1 cytochrome precursor clotide T9 Clitoria ternatea	1/946	1/946	0/365																			
5. AEK26403.1 cytochrome precursor clotide T2 Clitoria ternatea	2/282	1/946	0/525	0/491																		
6. AEK26408.1 cytochrome precursor clotide T8 Clitoria ternatea	1/946	2/100	0/365	0/42	0/491																	
7. AEK26407.1 cytochrome precursor clotide T7 Clitoria ternatea	2/100	2/100	0/395	0/178	0/491	0/154																
8. AEK26405.1 cytochrome precursor clotide T4 Clitoria ternatea	2/100	2/282	0/525	0/203	0/458	0/178	0/178															
9. AEK26412.1 cytochrome precursor cter B Clitoria ternatea	2/282	2/100	0/491	0/308	0/560	0/308	0/281	0/254														
10. AFH57365.1 cytochrome precursor chassatide C18 Chassalla chartacea	1/184	0/896	2/282	2/282	2/100	2/100	2/506	2/282	2/282													
11. AFH57352.1 cytochrome precursor chassatide C2 Chassalla chartacea	1/059	0/801	2/506	2/506	2/282	2/506	2/506	2/793	2/282	0/395												
12. ABO21630.1 cytochrome precursor protein Mra13 Melicytus ramiflorus	0/947	0/596	1/946	1/946	1/946	1/946	1/946	1/812	1/812	1/812	1/059											
13. ABO21629.1 cytochrome precursor protein Mra4 Melicytus ramiflorus	0/947	0/308	2/282	2/282	2/100	2/506	2/282	2/282	2/100	0/947	0/801	0/491										
14. AAU04394.1 cytochrome c3 precursor Viola odorata	1,001	0/721	2/100	1/946	1/946	2/100	2/100	2/282	2/100	0/896	0/801	0/596	0/308									
15. AAU04392.1 cytochrome c2 precursor Viola odorata	1/059	0/308	1/812	2/100	1/812	1/946	2/100	2/282	2/282	0/896	0/847	0/756	0/365	0/281								
16. AAU04393.1 cytochrome c1 precursor Viola odorata	1/059	0/308	1/946	2/100	1/812	1/946	2/100	2/282	2/282	0/847	0/801	0/801	0/365	0/308	0/42							
17. ALI30827.1 cytochrome precursor Viola tricolor	0/847	0/458	1/946	1/946	2/100	2/282	2/282	2/282	0/801	0/801	0/596	0/426	0/491	0/395	0/426							
18. ALI30822.1 cytochrome precursor Viola tricolor	1/119	0/634	1/589	2/100	1/812	1/946	2/100	2/282	1/946	0/896	0/801	0/634	0/634	0/458	0/491	0/596						
19. ALI30823.1 cytochrome precursor Viola tricolor	1/253	0/560	2/100	1/946	2/282	2/100	2/100	2/506	1/001	1/119	0/847	0/525	0/560	0/458	0/458	0/525	0/847					
20. AFM52763.1 cytochrome precursor 2 Petunia x hybrida	1,001	0/896	1/946	2/100	2/506	1/946	2/506	2/282	2/100	0/947	0/947	1/184	0/947	0/847	0/896	0/947	1/119	1/001	1/253			
21. XP_057872432.2 clustered mitochondria protein Cryptomeria japonica	2/506	1/946	2/100	1/946	1/946	1/946	2/100	1/812	1/946	1/946	2/282	2/282	2/282	1/946	1/812	1/812	1/812	1/812	1/812	1/946	2/100	

شکل ۴. بررسی فاصله ژنتیکی بین توالی‌های سیکلوتیدها

نتایج هم‌ردیفی دو توالی سیکلوتیدهای با شماره دسترسی (ACG69852.1 و AAU04394.1) با کمترین فاصله ژنتیکی ۰,۰۲۱ نشان می‌دهد. سه جهش در این دو توالی اتفاق می‌افتد که در توالی ACG69852.1 جایگزینی آمینواسید والین(V) با آمینو اسید آلانین(A) سبب ایجاد خاصیت آبرگریزی شده و در توالی AAU04394.1 آمینواسید گلايسين(G) جایگزین آمینو اسید آلانین(A) که خاصیت آمفی‌پاتیک (هم سر آبدوست و هم سر آبرگریز دارد)، دارد، غیرقطبی است اما در واکنش‌های آبرگریز شرکت نمی‌کند. جهش‌های آلانین از نظر ساختاری مورد بررسی قرار گرفته‌است. در این توالی‌ها (ACG69852.1 و AAU04393.1) در هم‌ردیفی جهش‌زایی با آمینواسید آلانین مشاهده شد(شکل ۵).

	M D A K K M F V A L V L V A T F A L P S L A T F E K D F I T	Majority
	10 20 30	
1	M D A K K M F V A L V L I A T F A L P S L A T F E K D F I T	AAU04394.1.cy.pro.seq
1	M D A K K M F V A L V L V A T F V L P S L A T F E K D F I T	ACG69852.1.cy.seq
	P E T I Q A I L K K S A P L S N I M L E E D V I N A L L K S	Majority
	40 50 60	
31	P E T I Q A I L K K S A P L S N I M L E E D V I N A L L K S	AAU04394.1.cy.pro.seq
31	P E T I Q A I L K K S A P L S N I M L E E D V I N A L L K S	ACG69852.1.cy.seq
	K T V I S N P I I E E A F L K N S N G L N G I P C G E S C V	Majority
	70 80 90	
61	K T V I S N P I I E E A F L K N S N G L N G I P C G E S C V	AAU04394.1.cy.pro.seq
61	K T V I S N P I I E E A F L K N S N G L N G I P C G E S C V	ACG69852.1.cy.seq
	W I P C I S G A I G C S C K S K V C Y R N S L D N	Majority
	100 110	
91	W I P C I S A I A I G C S C K S K V C Y R N S L D N	AAU04394.1.cy.pro.seq
91	W I P C I S G A I G C S C K S K V C Y R N S L D N	ACG69852.1.cy.seq

شکل ۵. هم‌ردیفی توالی دو سیکلوتید از دو گونه *Viola Baoshanensis* و *Viola odorata*

نتایج حاصل از بررسی توالی‌های سیکلوتید در وب سایت Softberry نشان می‌دهد که این دو توالی‌ها دارای آمینو اسید سیستئین که در بیشتر آنها ۶ سیستئین وجود دارد که احتمالاً در ۳ پیوند دی سولفیدی شرکت می‌کنند. در بین این پپتیدها توالی ACG69861.1 با ۱۸ سیستئین و ۹ پیوند دی سولفیدی بیشترین تعداد و پیوند را دارد و توالی‌های گونه *Clitoria Ternatea* با شماره دسترسی AEK26408.1 و AEK26409.1، ۱۱ سیستئین و ۵ پیوند مشاهده شد و باقی توالی‌های این گونه ۱۰ سیستئین و ۴ پیوند دی سولفیدی دارند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش ۱۹ توالی پروتئینی سیکلوتید با ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مهم‌ترین نتایج این مطالعه، شناسایی دامین حفاظت شده عملکردی سیکلوتید (Pfam03784) در اکثر توالی‌ها بود. این دامنه به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک ویژگی حیاتی برای پایداری و ساختار حلقوی سیکلوتیدها شناخته شده است. خانواده سیکلوتیدها، که به دلیل مقاومت در برابر تخریب پروتئولیتیک و پایداری ساختاری خود معروف هستند، در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند ([25] و [26]). وجود این دامنه در توالی‌های مورد مطالعه، این فرضیه را تایید می‌کند که سیکلوتیدها پپتیدهای تکاملی محافظتی هستند که نقش‌های حیاتی در گیاهان دارند، به ویژه در مکانیسم‌های دفاعی. علاوه بر این، شناسایی دامنه (Pfam16720) Albumin_I_a در *Clitoria*

ternatea نیز جالب است، چرا که این دمین حفاظت شده عملکردی معمولاً با ویژگی‌های شبیه آلبومین، که ممکن است نقش‌هایی در انتقال یا ذخیره مواد ایفا کند، مرتبط است [27].

نتایج پیش‌بینی توالی سیگنال پپتید نشان داد که تمام سیکلوتیدهای مورد مطالعه دارای سیگنال پپتید ترش‌حی در انتهای آمینی توالی خود هستند که آنها را به ناحیه خارج سلولی هدایت می‌کند. این یافته با خواص عملکردی سیکلوتیدها هماهنگ است، زیرا این پپتیدها معمولاً در محیط‌های خارج سلولی به‌منظور حفاظت از گیاهان در برابر شکارچیان و پاتوژن‌ها عمل می‌کنند [28]. این موضوع با شواهد بیوانفورماتیکی موجود در دیگر مطالعات نیز تطابق دارد که در آن سیکلوتیدها به‌عنوان پپتیدهایی با مسیر ترش‌حی پیش‌بینی شده‌اند [29]. ماهیت ترش‌حی سیکلوتیدها باعث تقویت پتانسیل آنها به‌عنوان درمان‌های طبیعی گیاهی می‌شود، زیرا این پپتیدها می‌توانند به‌سادگی از ماتریس‌های خارج سلولی استخراج شوند یا حتی از طریق فناوری‌های بازترکیب برای استفاده در داروسازی تولید گردند.

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی تنوع زیادی را در میان سیکلوتیدها نشان داد، به‌طوری‌که وزن مولکولی آنها از ۸۵۰۲،۱۳ تا ۲۰۸۹۵،۴۷ دالتن متغیر بود و شاخص پایداری آنها از پروتئین‌های با ثبات بالا تا توالی‌های ناپایدارتر متغیر بود. به‌ویژه، توالی از *Melicytus ramiflorus* (ABO21630.1) با شاخص پایداری ۱۷،۱۹، بالاترین پایداری را نشان داد که نشان‌دهنده پپتیدی بسیار پایدار است. ناپایداری پروتئین‌ها بیانگر میزان پایداری آن‌ها در لوله‌های آزمایش است. به طوری که اگر این عدد پایینتر از ۴۰ باشد به‌عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته می‌شود. این چنین پایداری‌ای ویژگی‌ای بارز از سیکلوتیدها است و به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مقاومت آنها در برابر تخریب پروتئولیتیک به شمار می‌رود. [30] نتایج با گزارش‌های پیشین که پایداری سیکلوتیدها در گونه‌های مختلف گیاهی را تایید می‌کنند تطابق دارد [29]. علاوه بر این، شاخص‌های آلیفاتیک، نقطه ایزوالکتریک و مقادیر GRAVY نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه در ویژگی‌های هیدروفوبیسیته و حل‌شدگی سیکلوتیدها هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عملکردهای مختلف و تعاملات پیچیده آنها در سیستم‌های گیاهی اشاره داشته باشند.

به‌ویژه، هیدروفوبیک بودن برخی توالی‌ها مانند AEK26403.1 می‌تواند نشان‌دهنده نقش آنها در فرآیندهای مرتبط با غشا یا تعامل با مولکول‌های هیدروفوبیک باشد. از سوی دیگر، توالی‌های آمفی‌پاتیک مانند AAU04394.1 ممکن است خواص ضد میکروبی از خود نشان دهند [31].

آنالیز ساختار ثانویه نشان داد که توالی‌های سیکلوتید از ۲۸,۵٪ تا ۵۱,۲۶٪ مارپیچ آلفا^۱، از ۷,۶۶٪ تا ۲۴,۰۵٪ رشته کشیده^۲، از ۰,۸۷٪ تا ۱۰,۶۳٪ چرخش بتا^۳ و از ۳۳,۰۰٪ تا ۵۰,۷۶٪ کلاف تصادفی^۴ برخوردارند. بیشترین مقادیر مارپیچ آلفا در توالی *Viola tricolor* (ALI30827.1) مشاهده شد که می‌تواند به پایداری بیشتر و بهبود عملکرد بیولوژیکی پپتیدهای سیکلوتید کمک کند، زیرا مارپیچ‌های آلفا با پایداری پپتیدها مرتبط هستند [32]. حضور رشته‌های کشیده و چرخش‌های بتا نشان‌دهنده تنوع ساختاری و تطابق عملکردی سیکلوتیدها در میان گونه‌های مختلف است، زیرا این ساختارهای ثانویه به ترکیب ساختار و پایداری کلی پپتیدهای حلقوی کمک می‌کنند. تحلیل‌های فیلوژنتیکی نشان داد که سیکلوتیدها به دو خوشه اصلی تقسیم می‌شوند، با این که سیکلوتیدهای *Clitoria ternatea* در یک گروه با شباهت بالای ۱۰۰٪ گروه‌بندی شده‌اند. این یافته‌ها با گزارش‌های پیشین تطابق دارد که نشان می‌دهند سیکلوتیدهای متعلق به یک گونه گیاهی اغلب با یکدیگر خوشه‌بندی می‌شوند، که نشان‌دهنده مسیره‌های تکاملی مشترک است [31]. خوشه دوم، که سیکلوتیدهای باقی‌مانده را در خود جای داده است، تفاوت‌های ژنتیکی را نشان می‌دهد که ممکن است نشان‌دهنده تنوع عملکردی آنها باشد. تحلیل فاصله ژنتیکی با تایید نتایج نشان داد که سیکلوتیدهای متعلق به یک گیاه، کمترین فاصله ژنتیکی را دارند. تحلیل ترتیب‌ها نشان داد که در توالی‌های با کمترین فاصله ژنتیکی (ACG69852.1)

۱. Alpha helix

۲. Strand Extended

۳. Beta turn

۴. Random coil

و (AAU04394.1) جهش‌هایی مشاهده شد، به‌ویژه جایگزینی والین (V) با آلانین (A) در ACG69852.1 که باعث افزایش هیدروفوبیسیته می‌شود، و جایگزینی گلیسین (G) با آلانین (A) در AAU04394.1 که خواص آمفی‌پاتیک ایجاد می‌کند. این جهش‌ها ممکن است تاثیر زیادی بر خواص هیدروفوبیک و ضد میکروبی پپتیدها داشته باشند و به‌طور بالقوه بر فعالیت‌های زیستی آنها تاثیر بگذارند [28].

نتایج تحلیل سیستم‌ها نشان داد که بیشتر سیکلوتیدها دارای ۶ سیستمین و ۳ پیوند دی‌سولفیدی هستند. (توالی ACG69861.1 با ۱۸ سیستمین و ۹ پیوند دی‌سولفیدی، بیشترین تعداد سیستمین و پیوندهای دی‌سولفیدی را دارد که این ویژگی به پایداری و مقاومت ساختاری آن کمک می‌کند. پیوندهای دی‌سولفیدی نقش مهمی در پایداری و ترکیب ساختاری پپتیدهای سیکلوتید دارد. این پیوندها بین دو باقی مانده سیستمین ایجاد می‌شوند و یک پیوند کووالانسی ایجاد می‌کنند که به حفظ ساختار کلی سه بعدی پپتید کمک می‌کند. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در پپتیدهای سیکلوتیدی به پایداری آنها در برابر تخریب پروتئولیتیک و شرایط محیطی سخت کمک می‌کند. این پایداری به سیکلوتیدها اجازه می‌دهد تا فعالیت زیستی و یکپارچگی ساختاری خود را حفظ کنند و آنها را به نامزدهای بالقوه برای توسعه دارو و کاربردهای درمانی تبدیل کند. علاوه بر این، پیوندهای دی‌سولفیدی همچنین می‌توانند بر چین خوردگی و ترکیب پپتیدهای سیکلوتید تاثیر بگذارند و بر تعامل آنها با مولکول‌های هدف و فعالیت‌های بیولوژیکی تاثیر بگذارند. ترتیب خاص و تعداد پیوندهای دی‌سولفید در سیکلوتیدها می‌تواند بر میل ترکیبی ویژگی‌های عملکردی آنها تاثیر بگذارد [33].

۵. پیشنهادات

اخیرا در مهندسی ژنتیک برای تولید پروتئینی با خاصیت بیولوژیکی به بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، شاخص ناپایداری و تعیین دامین عملکردی حفاظت شده و همچنین تعیین روابط فیلوژنتیکی به منظور شناسایی سیکلوتید حفاظت شده با خاصیت عملکردی مشابه پرداخته می‌شود. طبق بررسی‌های بیوانفورماتیکی سیکلوتیدها، توالی AEK26412.1 در گونه گیاهی *Clitoria Ternatea* می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان

پپتید زیست فعال با فعالیت بیولوژیکی به خصوص درمان سرطان به منظور تولید در میزبان‌های بیانی مختلف باشد زیرا با توجه به بررسی پایداری، میزان آلفاهلیکس و بار مثبتش احتمالاً عملکرد خوبی را نسبت به سایر همتایانش نشان می‌دهد. لذا برای تولید پپتیدهای نو ترکیب در مهندسی ژنتیک پیشنهاد می‌شود که از لحاظ خواص فیزیکوشیمیایی و ساختاری مورد بررسی قرار گیرد.

۶. مراجع

- [1] N. Ghadiri *et al.*, “Bioactive peptides: an alternative therapeutic approach for cancer management,” *Front. Immunol.*, vol. 15, no. January, pp. 1–18, 2024, doi: 10.3389/fimmu.2024.1310443.
- [2] D. Ramadhani, R. Maharani, A. M. Gazzali, and M. Muchtaridi, “Cyclic Peptides for the Treatment of Cancers: A Review,” *Molecules*, vol. 27, no. 14, 2022, doi: 10.3390/molecules27144428.
- [3] J. N. Zhang, Y. X. Xia, and H. J. Zhang, “Natural cyclopeptides as anticancer agents in the last 20 years,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 8, 2021, doi: 10.3390/ijms22083973.
- [4] M. H. et al. G. Kilic-Berkmen, G. Defazio, “HHS Public Access Author manuscript Gastroenterology,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 5, pp. 139–148, 2022, doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00539.Discovery.
- [5] H. Zhang and S. Chen, “Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001-2021),” *RSC Chem. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 18–31, 2022, doi: 10.1039/d1cb00154j.
- [6] W. Mansouri *et al.*, “Efficacy and tolerability of AFPep, a cyclic peptide with anti-breast cancer properties,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 345, pp. 10–18, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.TAAP.2018.03.004.
- [7] W. Xiao *et al.*, “High-affinity peptide ligand LXY30 for targeting $\alpha\beta 1$ integrin in non-small cell lung cancer,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0740-7.
- [8] J. T. Chen, R. Ma, S. C. Sun, X. F. Zhu, X. L. Xu, and Q. Mu, “Synthesis and biological evaluation of cyclopeptide GG-8-6 and its analogues as anti-hepatocellular carcinoma agents,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 26, no. 3, pp. 609–622, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.BMC.2017.12.028.
- [9] L. Mehta, R. Dhankhar, P. Gulati, R. K. Kapoor, A. Mohanty, and S. Kumar, “Natural and grafted cyclotides in cancer therapy: An insight,” *J. Pept. Sci.*, vol. 26, no. 4–5, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1002/psc.3246.
- [10] Y. Ding and X. Xue, “Medicinal Chemistry Strategies for the Modification of Bioactive Natural Products,” *Molecules*, vol. 29, no. 3, 2024, doi: 10.3390/molecules29030689.

- [11] Q. Du, Y. H. Huang, C. K. Wang, Q. Kaas, and D. J. Craik, "Mutagenesis of bracelet cyclotide hyen D reveals functionally and structurally critical residues for membrane binding and cytotoxicity," *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 4, pp. 1–10, 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.101822.
- [12] P. Lindholm *et al.*, "Cyclotides: A novel type of cytotoxic agents," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 6, pp. 365–369, 2002.
- [13] J. Tang *et al.*, "Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*," *Peptides*, vol. 31, no. 8, pp. 1434–1440, 2010, doi: 10.1016/j.peptides.2010.05.004.
- [14] Q. Du *et al.*, "Discovery and mechanistic studies of cytotoxic cyclotides from the medicinal herb *Hybanthus enneaspermus*," *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 32, pp. 10911–10925, 2020, doi: 10.1074/jbc.ra120.012627.
- [15] S. M. Simonsen *et al.*, "Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 15, pp. 9805–9813, 2008, doi: 10.1074/jbc.M709303200.
- [16] E. Svängård, R. Burman, S. Gunasekera, H. Lövborg, J. Gullbo, and U. Göransson, "Mechanism of action of cytotoxic cyclotides: Cycloviolacin O2 disrupts lipid membranes," *J. Nat. Prod.*, vol. 70, no. 4, pp. 643–647, 2007, doi: 10.1021/np070007v.
- [17] S. Gerlach *et al.*, "The Membrane-Active Phytopeptide Cycloviolacin O2 Simultaneously Targets HIV-1-infected Cells and Infectious Viral Particles to Potentiate the Efficacy of Antiretroviral Drugs," *Medicines*, vol. 6, no. 1, p. 33, 2019, doi: 10.3390/medicines6010033.
- [18] S. M. Simonsen *et al.*, "Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 15, pp. 9805–9813, 2008, doi: 10.1074/jbc.M709303200.
- [19] F. Teufel *et al.*, "SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models," *Nat. Biotechnol.*, vol. 40, no. 7, pp. 1023–1025, 2022, doi: 10.1038/s41587-021-01156-3.
- [20] M. T. Ødum *et al.*, "DeepLoc 2.1: multi-label membrane protein type prediction using protein language models," *Nucleic Acids Res.*, vol. 52, no. W1, pp. W215–W220, 2024, doi: 10.1093/nar/gkae237.
- [21] A. J. Link, "2-D Proteome Analysis Protocols," *2-D Proteome Anal. Protoc.*, vol. 112, pp. 531–552, 1998, doi: 10.1385/1592595847.
- [22] L. J. McGuffin, K. Bryson, and D. T. Jones, "The PSIPRED protein structure prediction server," *Bioinformatics*, vol. 16, no. 4, pp. 404–405, 2000, doi: 10.1093/bioinformatics/16.4.404.
- [23] C. Geourjon and G. Deléage, "Sopma: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments," *Bioinformatics*, vol. 11, no. 6, pp. 681–684, 1995, doi: 10.1093/bioinformatics/11.6.681.
- [24] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6:

- Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729, 2013, doi: 10.1093/molbev/mst197.
- [25] A. Gould, Y. Ji, T. L. Aboye, and J. A. Camarero, “Cyclotides, a Novel Ultrastable Polypeptide Scaffold for Drug Discovery,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 17, no. 38, pp. 4294–4307, 2012, doi: 10.2174/138161211798999438.
- [26] R. Hellinger, J. Koehbach, D. E. Soltis, E. J. Carpenter, G. K. S. Wong, and C. W. Gruber, “Peptidomics of circular cysteine-rich plant peptides: Analysis of the diversity of cyclotides from *viola tricolor* by transcriptome and proteome mining,” *J. Proteome Res.*, vol. 14, no. 11, pp. 4851–4862, 2015, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00681.
- [27] D. A. Belinskaia, P. A. Voronina, and N. V. Goncharov, “Integrative Role of Albumin: Evolutionary, Biochemical and Pathophysiological Aspects,” *J. Evol. Biochem. Physiol.*, vol. 57, no. 6, pp. 1419–1448, 2021, doi: 10.1134/s002209302106020x.
- [28] U. Huseyinoglu, N. Huseyinoglu, E. Hamurtekin, H. Aygun, and B. Sulu, “Effect of pregabalin on post-dural-puncture headache following spinal anesthesia and lumbar puncture,” *J. Clin. Neurosci.*, vol. 18, no. 10, pp. 1365–1368, 2011, doi: 10.1016/j.jocn.2011.02.029.
- [29] G. K. T. Nguyen *et al.*, “Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the fabaceae family,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 27, pp. 24275–24287, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.229922.
- [30] J. M. Escoffre *et al.*, “Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 60, no. 1, pp. 78–87, 2013, doi: 10.1109/TUFFC.2013.2539.
- [31] J. Koehbach *et al.*, “Cyclotide discovery in Gentianales revisited—identification and characterization of cyclic cystine-knot peptides and their phylogenetic distribution in Rubiaceae plants,” *Biopolymers*, vol. 100, no. 5, pp. 438–452, 2013, doi: 10.1002/bip.22328.
- [32] K. J. Rosengren, N. L. Daly, M. R. Plan, C. Waine, and D. J. Craik, “Twists, knots, and rings in proteins: Structural definition of the cyclotide framework,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 10, pp. 8606–8616, 2003, doi: 10.1074/jbc.M211147200.
- [33] Y. Zhang, K. Schulten, M. Gruebele, P. S. Bansal, D. Wilson, and N. L. Daly, “Disulfide bridges: Bringing together frustrated structure in a bioactive peptide,” *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1744–1752, 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.027.