

## **Rational Design, Structural Characterization, and Recombinant Expression of Antibacterial Wuchuanin-A1 Peptide Analogs**

**RIZKI AMALIA PUTRI**

**22/507099/SPA/00897**

### **ABSTRACT**

Antimicrobial peptides (AMPs) are promising alternatives to conventional antibiotics due to their ability to disrupt bacterial membranes, thereby reducing the likelihood of resistance development. Wuchuanin-A1, a frog-skin-derived peptide, exhibits antibacterial activity but suffers from limited structural stability and weak amphipathicity. This study aimed to enhance the antibacterial properties of wuchuanin-A1 through rational molecular design, structural modifications, and biophysical characterization.

Rationally designed peptide analogs were generated by substituting helix-disrupting residues with helix-promoting amino acids (Leu, Lys, and Glu). The structural changes of these modifications were assessed using molecular dynamics (MD) simulations and *in silico* prediction tools, which provided insights into amphipathicity, helical stability, and membrane-binding potential. In parallel, recombinant expression of the peptide analogs was explored in *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 to investigate their potential for biotechnological production. To further evaluate the impact of N- and C-terminal capping, structural, and functional analyses of the synthetic analogs were performed using circular dichroism (CD), nuclear magnetic resonance (NMR), and Langmuir monolayer assays.

The structural modifications, particularly terminal capping and targeted substitutions, significantly increased  $\alpha$ -helicity, improved peptide-membrane interactions, and enhanced antibacterial activity compared to the native peptide. Among the designed analogs, Analog-7 and Analog-8 exhibited superior activity against *S. aureus* and *E. coli*, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of 3.91  $\mu\text{g/mL}$  and 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, representing 2- to 32-fold lower MICs than Analog-5. Collectively, these results establish a rational design framework for optimizing wuchuanin-A1 analogs and demonstrate that combining amino acid substitution with terminal modifications effectively enhances both structural stability and antibacterial potency. These findings provide a strong foundation for the further development of frog-skin-derived antimicrobial peptides as promising new antibacterial agents.

**Keywords:**  $\alpha$ -helical peptides, amphipathic helix, structural modification, peptide characterization, and *in vitro* antibacterial activity.

## Desain Rasional, Karakterisasi Struktural, dan Ekspresi Rekombinan Peptida Analog Wuchuanin-A1 sebagai Kandidat Antibakteri

RIZKI AMALIA PUTRI

22/507099/SPA/00897

### INTISARI

Peptida antimikroba (PAM) merupakan alternatif kandidat yang tepat untuk mengganti penggunaan antibiotik konvensional karena kemampuannya dalam mengganggu kestabilan membran bakteri. Mekanisme aksi peptida yang seperti ini dapat menurunkan kemungkinan terjadinya resistensi. Wuchuanin-A1, peptida yang berasal dari kulit katak, diketahui memiliki aktivitas antibakteri, namun masih memiliki keterbatasan dalam hal stabilitas struktur dan sifat amfipatik yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas antibakteri wuchuanin-A1 melalui desain molekuler, modifikasi struktur, serta karakterisasi biofisik.

Analog peptida turunan wuchuanin-A1 dirancang secara rasional dengan mengganti residu pengganggu heliks dengan asam amino pembentuk heliks (Leu, Lys, Glu). Perubahan struktural dari modifikasi ini dievaluasi menggunakan simulasi dinamika molekuler (MD) dan studi *in silico*, yang memberikan gambaran mengenai amfipatisitas, stabilitas heliks, dan potensi pengikatan membran. Secara paralel, ekspresi rekombinan dari analog peptida juga dilakukan pada *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 untuk menilai potensinya untuk diproduksi secara bioteknologi. Untuk mengevaluasi lebih lanjut dampak modifikasi pada ujung N- dan C-terminal (*capping*), analisis struktural dan fungsional dari analog sintesis dilakukan menggunakan *circular dichroism* (CD), *nuclear magnetic resonance* (NMR), dan uji *monolayer* Langmuir.

Modifikasi struktural, khususnya *terminal capping* dan substitusi terarah pada sekuens asam amino peptida, secara signifikan meningkatkan struktur sekunder  $\alpha$ -heliks, meningkatkan interaksi peptida-membran, serta meningkatkan aktivitas antibakteri peptida analog dibandingkan dengan peptida *native*. Di antara peptida analog yang telah dirancang, Analog-7 dan Analog-8 menunjukkan aktivitas paling unggul terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, dengan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) masing-masing 3,91  $\mu\text{g/mL}$  dan 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , yakni 2–32 kali lebih rendah dibandingkan dengan Analog-5. Secara keseluruhan, hasil ini menetapkan kerangka desain rasional untuk optimalisasi peptida analog wuchuanin-A1 dan menunjukkan bahwa kombinasi substitusi asam amino dengan modifikasi terminal pada peptida secara efektif dapat meningkatkan stabilitas struktural dan potensi antibakteri dari peptida analog yang dihasilkan. Hasil dari penelitian ini memberikan landasan kuat bagi pengembangan lebih lanjut peptida antimikroba yang berasal dari kulit katak sebagai kandidat agen antibakteri yang menjanjikan.

**Kata kunci:** peptida  $\alpha$ -heliks, heliks amfipatik, modifikasi struktur peptida, karakterisasi peptida, dan studi *in vitro* aktivitas antibakteri.