

Comparison of Antimicrobial Properties and Toxicity of Natural S3 Peptide with Horseshoe Crab Amoebocyte Origin and its Mutants

Sadegh Rezaei¹ , Sahin Hadadian^{2*} , Ramazan Ali Khavarinejad¹, Dariush Norouzian²

¹ Dept of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Dept of Nanotechnology, New Technologies Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 19 May 2021
Revised: 07 June 2021
Accepted: 01 September 2021

*** Correspondence to:**
Shahin Hadadian
Dept of Nanotechnology, New
Technologies Research Group,
Pasteur Institute of Iran, Tehran,
Iran
Email: hadadian@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial peptides (AMPs) are compounds with antimicrobial properties that are studied widely due to the development of resistance of pathogenic bacteria to antibiotics. In the present study, the toxicity and antimicrobial effects of two natural monomeric peptides (S3 and SΔ3) were compared with S3-SΔ3 hybrids and S3 tetramers.

Material & Methods: Protein hybrids (SΔ3S3-2mer-GS) S3-SΔ3 and tetramer protein S3 (S3-4mer-GS) were expressed in *E. coli*. BL21 (DE3). Following that, the presence of mutant peptides was confirmed, and their antimicrobial activity was compared and evaluated with S3 and SΔ3 monomers. Finally, the toxicity of tetramer and hybrid made on the MDA-MB-231 cell line was evaluated and compared.

Findings: The toxicity of the hybrid was slightly increased, compared to the tetramer for eukaryotic cells; however, this increase was negligible at the active concentration of this protein. Cell survival for hybrids was lower for S3 and SΔ3; nonetheless, cell survival for each sequence decreased with increasing time. Furthermore, the inhibition of hybrid microbial growth was improved and compared with tetramer and S3-SΔ3. It was found that an increase in the positive charge of the hybrid protein did not have a toxic effect on the host bacteria.

Discussion & Conclusion: Due to the appropriate expression and increased antimicrobial activity and negligible cytotoxicity, the hybrid peptide S3-SΔ3 and tetramer S3 can be considered an effective production strategy to obtain AMPs.

Keywords: Antimicrobial peptides, Factor c, Horseshoe crab, S3-SΔ3 protein hybrid, Tetramer S3 peptide

How to cite this paper

Rezaei S, Hadadian Sh, Khavarinejad RA, Norouzian D. Comparison of Antimicrobial Properties and Toxicity of Natural S3 Peptide with Horseshoe Crab Amoebocyte Origin and its Mutants. Journal of Ilam University of Medical Sciences. November 2021;29(4): 60-73.



مقایسه خاصیت ضد میکروبی و سمیت پپتید S3 طبیعی با منشأ خرچنگ نعل اسبی، با موتانت های حاصل از آن

صادق رضایی^۱، شاهین حدادیان^{۲*}، رمضانعلی خاوری نژاد^۱، داریوش نوروزیان^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فناوری های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

نویسنده مسئول:

شاهین حدادیان

گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه

تحقیقات فناوری های نوین، انستیتو

پاستور ایران، تهران، ایران

Email:

hadadian@yahoo.com

مقدمه: پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی هستند که به سبب ظهور مقاومت باکتری های بیماری زا به آنتی بیوتیک ها، مطالعه و بررسی می شوند. در مطالعه حاضر، آثار سمیت و ضد میکروبی دو پپتید مونومری S3 طبیعی به عنوان استاندارد و SA3 با هیبرید S3-SA3 و تترامر S3 بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش ها: هیبرید پروتئینی (SA3S3-2mer-GS) S3-SA3 و پروتئین تترامر S3 (S3-4mer-GS) در باکتری *E.coli*. BL21 (DE3) بیان شدند؛ سپس وجود پپتیدهای موتانت تأیید و فعالیت ضد میکروبی آن ها با مونومرهای S3 و SA3 مطالعه گردید. در نهایت، سمیت تترامر و هیبرید ساخته شده روی رده سلولی MDA-MB-231 ارزیابی و مقایسه شد. **یافته ها:** در بیان پروتئین نوترکیب، افزایش بار مثبت در پروتئین هیبرید برای باکتری میزبان اثر سمیت ایجاد نمی کند. میزان سمیت هیبرید در مقایسه با تترامر برای سلول های یوکاریوتی افزایش کمی داشت؛ اما در غلظت فعال این پروتئین، این افزایش ناچیز بود. میزان بقای سلولی در مورد هیبرید از S3 و SA3 کمتر است؛ اما میزان بقای سلولی برای هر یک از توالی ها، با افزایش زمان کاهش پیدا می کرد. علاوه بر این، بازدارندگی رشد میکروبی هیبرید نسبت به تترامر، SA3 و S3 بهبود یافت.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به میزان بیان مناسب و افزایش فعالیت ضد میکروبی و سمیت سلولی اندک، پپتید هیبرید S3 هیبرید S3 و SA3 و تترامر S3 می تواند به عنوان یک استراتژی تولید مؤثر برای به دست آوردن AMP ها در نظر گرفته شوند.

واژه های کلیدی: پپتید تترامر S3، هیبرید پروتئینی S3-SA3، خرچنگ نعل اسبی، فاکتور C، پپتیدهای ضد میکروبی

استناد: رضایی، صادق؛ حدادیان، شاهین؛ خاوری نژاد، رمضانعلی؛ نوروزیان، داریوش. مقایسه خاصیت ضد میکروبی و سمیت پپتید S3 طبیعی با منشأ خرچنگ

نعل اسبی، با موتانت های حاصل از آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۰؛ ۷۳-۶۰.



حق مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یک یا چند آنتی‌بیوتیک و افزایش مقاومت دارویی باکتری‌ها به درمان با نسل‌های مختلف داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها که حاصل آن افزایش مرگ‌ومیر و بروز آثار جانبی داروهای موجود شده است، ضرورت مطالعه و تولید داروهای آنتی‌میکروبیال سنتتیک و طبیعی را دوچندان کرده است؛ از این رو، بررسی آثار پیتیدهای سنتتیک ضدباکتریایی می‌تواند راه را برای به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید هموار سازد. پیتیدهای ضد میکروبی اجزای مهمی از دستگاه ایمنی بسیاری از مهره‌داران و بی‌مهرگان هستند و در اولین خط دفاعی میزبان بر ضد تهاجم میکروارگانیسم‌ها حضور دارند. سمیت این پیتیدها به علت ظرفیت مداخله‌گر آن‌ها در غشای میکروبی است که با ایجاد منافذ در غشا، به مرگ سلولی می‌انجامد. پیتیدهای ضد میکروبی پیتیدهای کوچکی هستند که به سبب حضور لیزین و یا آرژنین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند. خاصیت اصلی ساختاری پیتیدهای ضد میکروبی که ناشی از بار مثبت و خاصیت آمفی‌پاتیک آن‌هاست، عامل فعالیت ضد میکروبی مستقیم این پیتیدها است (۱). پیتیدهای ضد میکروبی دو ویژگی جذاب دارند: اول اینکه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها است؛ ویژگی دوم، هدف قرار دادن غشاهای میکروبی است که مانع توانایی میکروب برای توسعه مقاومت علیه آن‌ها می‌شود (۲)؛ در نتیجه، این پیتیدها به واسطه قابلیت کاربرد آن‌ها، به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید، منفعت بسیار دارند. سازوکار فعالیت پیتیدهای ضد میکروبی، توانایی آن‌ها در تخریب غشای سلولی است. پیتیدهای ضد میکروبی می‌توانند با میکروارگانیسم‌ها به وسیله نیروهای الکترواستاتیک، میان اسیدهای آمینه مثبت خود با اسیدهای آمینه منفی روی سطح میکروارگانیسم‌ها برهم‌کنش کنند. از آنجا که بار منفی سطحی غشای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی بیشتر است، به نظر می‌رسد که پیتیدهای ضد میکروبی سازوکار

مشابهی در تخریب غشای این نوع سلول‌ها داشته باشند (۳). به سبب آنکه پیتیدهای ضد میکروبی از مولکول‌های مهم ایمنی ذاتی بدن هستند و سمیت سلولی اندکی دارند، می‌توانند در آینده‌ای نه‌چندان دور، به عنوان دارو در درمان بیماری‌های التهابی و همچنین شوک‌های سپتیک حاصل از اندوتوکسین باکتری‌ها استفاده شوند. پیتیدهای ضد میکروبی با سازوکارهای متفاوتی، بر سلول‌های مهاجم اثر می‌گذارند و باعث تخریب آن‌ها می‌گردند. این پیتیدها با اتصال به سلول‌های مهاجم از طریق گیرنده‌های اتصال، با سازوکارهایی از قبیل ایجاد منفذ در غشا، باعث مرگ سلولی می‌شوند. تحقیقات نشان می‌دهند که با افزایش درصد اتصال پیتید به سلول، آثار پیتید افزایش می‌یابد؛ بنابراین، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های گوناگون پیتید برای بررسی تغییرات اتصالی و آثار کشندگی پیتید ضروری است که از طریق تخریب غشایی و یا تخریب‌های درون سلولی اعمال می‌شوند (۴). به‌طور کلی سنتز پیتیدها، فرایند پیچیده، پرهزینه و زمان‌بری است و جداسازی پیتیدهای ضد میکروبی از منابع طبیعی آن‌ها نیز علاوه بر زمان‌بر و پرهزینه بودن، در بسیاری موارد، با حفظ تعادل اکوسیستم در تضاد خواهد بود (۵). این پیتیدها اغلب آمینواسیدهای تغییرشکل یافته و اصلاح‌شده‌ای دارند که با پروتئین‌های ساخته‌شده توسط ریبوزوم‌ها متفاوت‌اند. در حال حاضر، روش‌های تولید نو ترکیب به سبب بیان پروتئینی اندک و حساسیت به پروتئازهای موجود در محیط، مناسب نیست و امروزه، بیان پروتئین‌های هیبریدی و مولتی‌مر در عمل، روش‌هایی اقتصادی به نظر می‌آیند؛ اما درباره پیتیدهای خطی S1 یا S3 مشتق از پیتید Sushi خرچنگ نعل‌اسبی که یک سد دفاعی طبیعی در این جاندار در برابر تهاجم باکتری‌های گرم منفی است، در همه مقالات موجود از روش سنتز فاز جامد این پیتیدها استفاده شده و تنها گزارش تولید نو ترکیب آن‌ها، مربوط به بیان مولتی‌مر S3 در میزبان *E.coli* BL21 (DE3) است (۶). راثو و همکاران نیز در

سفارش داده شد. سازه های ژنی در وکتور (+) pET-26b دریافت گردید. برای سهولت، توالی mer-GS³-2S³SA و mer-GS³-4S به ترتیب با نام های توالی هیبریدی و تترامر نامیده می شوند.

تکثیر پلاسمید، تخلیص و تهیه سلول های مستعد: باکتری *E. coli TOP10F*¹ برای تکثیر پلاسمیدهای مدنظر استفاده شد. به این منظور، پس از تازه کردن محیط کشت این باکتری، وکتورهای طراحی شده حاوی ژن های مدنظر به آن منتقل گردید و روی محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک های کانامایسین و تتراسایکلین که موجب رشد اختصاصی سویه های دارای پلاسمید فوق است، کشت داده شد. پس از انتقال وکتورها به میزبان *E. Coli TOP10F*¹، فرایند تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Qiagen extraction kit (Germany) صورت گرفت و نمونه ها برای مشاهده کیفیت عمل استخراج، روی ژل آگارز ۱ درصد (Agarose RPI) برده شدند. برای انتقال سازه های ژنی به سلول های *E. Coli* لازم است که با استفاده از تیمارهای خارجی، سلول باکتری را آماده کرد. از استوک میزبان باکتریایی *E. Coli* سویه *BL21(DE3)* موجود در فریزر منفی ۷۰ درجه، ۱۰ میکرولیتر برداشته و با لوپ شیشه ای روی پلیت حاوی LB (LB agar Thermo Fisher) آگار کشت داده و پلیت به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. از هریک از کلنی های رشد یافته بر پلیت های بالا، یک کلنی برداشته و در ۵ میلی لیتر از محیط کشت LB (LB broth Thermo Fisher) مایع تلقیح گردید و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۳ تا ۴ ساعت با سرعت ۱۷۰ rpm کشت داده شد. هنگامی که جذب نوری سلول ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ (فاز لگاریتمی) رسید، سلول ها به کمک سانتریفوژ در دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه رسوب داده و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در ۹۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از (Sigma – CaCl₂ Aldrich) سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سلولها در دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه

سال ۲۰۰۵، پپتید ضد میکروبی hpAB-β را به صورت مولتی مر در *E. coli* BL21(DE3) بیان کردند و دریافتند که از میان حالات دایمر تا اکتامر آن، بیشترین میزان بیان در حدود ۲۷/۸ درصد مربوط به بیان ژن این پپتید به صورت تترامر بود (۷). پپتید SΔ3 واریانت ارتقا یافته پپتید S3 است که در آن با تغییر دو اسید آمینه G9 و E11 به لیزین، بار مثبت پپتید، خاصیت ضد میکروبی و البته اثر سمیت آن افزایش یافته است (۸). از سویی، تحقیقات نشان داده است که فرم های مولتی مر پپتید S3 نیز خاصیت ضد میکروبی دارند. لینکرهای گلایسین سرین به علت قابل انعطاف بودن و کاهش ممانعت فضایی اجزای متصل شده، باعث افزایش پایداری، فولدینگ مناسب و از همه مهم تر، سبب حفظ و حتی افزایش فعالیت بیولوژیکی قطعات پروتئینی متصل شده می گردند (۹). پپتیدهای غنی از گلایسین جداسازی شده از دستگاه های دفاعی موجوداتی نظیر عقرب و خرچنگ عقربی، خاصیت ضد میکروبی دارند (۱۰، ۱۱). ابتدا توالی هریک از سکانس ها با افزودن لینکر مدنظر، His tag و سایت انتروکینازی مشخص شد. در این مطالعه، توالی پپتیدهای مدنظر شامل یک توالی تترامر هیبریدی S3 و SΔ3 با لینکر گلایسین سرین (SΔ3S3-2mer-GS) (که پس از این، پروتئین هیبریدی نامیده می شود) و یک حالت تترامر پپتید S3 با لینکر گلایسین سرین (S3-4mer-GS) (که پس از این، پروتئین تترامر نامیده می شود)، به عنوان واریانت کنترل برای بررسی اثر بیان هیبریدی بودند. بر اساس تعاریف بالا، هدف اصلی این پژوهش تلاش برای طراحی و تولید موتانت های مؤثرتری از این پپتید به عنوان پپتیدهای ضد میکروبی است.

مواد و روش ها

سنترژن: برای تعیین توالی DNA، توالی های پروتئینی طراحی شده از ترجمه معکوس سایت ExPASy استفاده شد. سایت های برشی XhoI و NdeI به انتهای 5', 3' آن و دنباله هیستیدینی و همچنین سایت برش انتروکیناز به آن اضافه گردید و سنتر ژن به شرکت Biomatik کانادا

سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۶۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از CaCl_2 سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سلول‌ها دوباره در دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از CaCl_2 سرد حل گردید (۱۶).
 ترانسفورماسیون باکتری BL21 با وکتور نوترکیب: پس از آماده شدن سلول‌های مستعد، سازه ژنی به منظور بیان به باکتری E. coli سویه BL21(DE3) منتقل می‌شود. پس از انتقال سازه‌های ژنی به سلول‌های بیانی، سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، از طریق کشت روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین غربالگری گردید و کلنی‌های غربالگری شده در محیط کشت مایع LB کشت داده شدند. پس از رسیدن کشت باکتری به OD 0.6 در طول موج ۶۰۰ نانومتر، باکتری با افزودن IPTG با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار القا گردید و دوباره به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۶). مراحل بیان این پروتئین‌ها در باکتری با استفاده از آزمون SDS-PAGE و Western blot تأیید گردید.

استخراج پروتئین نوترکیب: پس از جداسازی بیومس از محیط کشت به وسیله سانتریفوژ، دیواره سلولی از طریق حل کردن پلت‌ها به نسبت ۱:۵ وزنی/حجمی در محلول لیزکننده (Tris Sigma-Aldrich, HCL 33% (Tris Sigma-Aldrich, HCL Adak shimi) ۲۰ میلی‌مولار pH=7.5 و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (ده پالس ۳۰ ثانیه - توقف ۳۰ ثانیه) شکسته شد و پس از شستشو و حذف بقایای دیواره سلولی شکسته شده، اینکلورژن بادی‌ها با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۹۰۰۰ rpm به صورت پلت جداسازی گردید و برای شستشو در بافر tris- HCl ۲۰ میلی‌مولار pH=7.5 حاوی اوره ۲ مولار (Urea Merck) حل شد و پس از سانتریفوژ بر اساس شرایط بالا، سوپرناتانت دور ریخته و پلت‌ها جمع‌آوری گردید؛ سپس اینکلورژن بادی شسته شده با استفاده از بافر tris- HCl ۲۰ میلی‌مولار pH=7.5 حاوی اوره ۶ مولار حل گردید (نسبت ۱:۵ وزنی/حجمی) و به مدت ۳۰

دقیقه در دمای ۴ درجه با همزن مغناطیسی همزده شد. در نهایت، با استفاده از سانتریفوژ، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm، مایع رویی حاوی پروتئین حل شده جمع‌آوری گردید (۱۶).

تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی یون فلزی (IMAC). برای تخلیص هریک از توالی‌ها، یک میلی‌لیتر رزین Agarose Bead (NiNTA Technologies-ABT) (۲ ml سوسپانسیون ۵۰ درصد) درون ستون HiTrap® (SP Fast Flow Cytiva Hitrap) HiTrap® (SP Fast Flow Cytiva Hitrap) یک میلی‌لیتری ریخته شد و پس از متعادل‌سازی با ۵ میلی‌لیتر بافر متعادل‌سازی با شدت جریان ۱ ml/min، نمونه به ستون اعمال گردید؛ سپس تا ستون با ۱۰ برابر حجم ستون از بافر متعادل‌سازی تا رسیدن جذب A280 به <0.01 و پس از آن، با ۴ برابر حجم ستون از بافر شستشو داده شد؛ سپس ۶ حجم از بافر شویش به ستون اعمال گردید و با مشاهده پیک، فرکشن‌های یک میلی‌لیتری مربوط به مشاهده پیک جمع‌آوری شدند (۷۶). در نهایت، ستون با استفاده از ۵ حجم محلول بازیابی برای استفاده مجدد شستشو داده و با عبور دادن اتانول ۲۰ درصد (دو حجم ستون) تا استفاده بعدی در یخچال نگهداری گردید. حضور پپتید هدف در نمونه شویش (جداسازی شده از ستون) با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد (۱۶). غلظت پروتئین‌های تخلیص شده با استفاده از اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر و تقسیم جذب نوری بر ضریب خاموشی ۰/۱ درصد آن‌ها محاسبه گردید. ضریب خاموشی پروتئین‌های تترامر و هیبرید با استفاده از توالی اسید آمینه‌های آن‌ها و با استفاده از تخمین خواص فیزیکی شیمیایی آن‌ها در سایت ExPASy به ترتیب معادل ۰/۸۸۳ و ۰/۸۸۷ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ تخمین زده شد (۱۷).

وسترن بلاتینگ (Western Blotting). پروتئین‌هایی که در مرحله پیش، در ژل SDS-PAGE از نظر اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی به روی کاغذ نیتروسولوز منتقل گردیدند. کاغذ نیتروسولوز ظرفیت بسیار مناسبی (در حدود $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) برای اتصال پروتئین‌ها

از سرم نمکی سترون تا رسیدن به غلظت سلولی CFU/ml $10^5 \times 5$ رقیق شد (حصول کدورت مشابه کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵). در شرایط سترون، میزان ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون در هریک از چاهک‌های ستون‌های ۲ الی ۱۰ ریخته شد. در چاهک‌های ستون شماره ۱۲ برای تست سترونی شرایط آزمون، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در چاهک‌های ۱، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از پروتئین‌های توالی‌های هیبریدی و تترامر با غلظت $3120 \mu\text{g/ml}$ (۲۰ برابر)، با استفاده از محیط کشت مولر هیتون ۱۰ برابر رقیق گردید و به غلظت $312 \mu\text{g/ml}$ رسانده شد (غلظت نهایی دو برابر)؛ سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هریک آن‌ها در چاهک‌های ۱ ردیف‌های مربوطه ریخته شد. با کمک سمپلر مولتی چنل، ۲۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های ۱ به درون چاهک‌های ۲ ریخته و با ادامه این کار تا چاهک‌های شماره ۱۰، رقت‌های متوالی با نسبت ۴/۵ تهیه گردید؛ سپس به هریک از چاهک‌های ۱ الی ۱۰ و چاهک‌های ستون ۱۱، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده اضافه گردید؛ بنابراین، چاهک‌های ۱ الی ۱۰ به رقت‌های متوالی پپتیدها، چاهک‌های ستون ۱۱ به کنترل مثبت باکتری (رشد حداکثر سویه) و چاهک‌های ستون ۱۲ به کنترل منفی باکتری (تست سترونی آزمون) اختصاص داده شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد و حداقل غلظتی از پروتئین که جذب آن معادل ۹۰ درصد جذب سلول فاقد پروتئین بود، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین (MIC) انتخاب گردید (۱۳). آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به‌صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. استاندارد مک فارلند ۰/۵ طبق پروتکل موجود تهیه و استفاده شد (۱۹). با استفاده از درون‌یابی، مقادیر MIC برای همه تکرارها تعیین گردید و آنالیزهای آماری روی این مقادیر انجام شد. از منحنی Box-Plot برای تشخیص داده‌های پرت (Outlier) و از آزمون Shapiro-Wilk برای بررسی توزیع نرمال نتایج MIC

نشان می‌دهد. در این تحقیق، از دستگاه (Semi bio rad) Dry برای انتقال باندهای پروتئینی استفاده شد. برای جلوگیری از انتقال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها به سطح کاغذ نیتروسولوز، کاغذ به مدت O/N در بافر Phosphate buffered saline (PBS Gibco) حاوی 5% Serum Albumin (BSA Siga-Aldrich) قرار داده شد. روز بعد، پس از ۳ بار شستشوی کاغذ با بافر PBS حاوی ۰/۰۵% Tween20 (Tween RPI)، آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی متصل به آنزیم پراکسیداز، با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر PBS به روی کاغذ نیتروسولوز اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. پس از شستشوی مجدد کاغذ با بافر شستشو، برای تشخیص باندهای پروتئینی سوبسترای آنزیم پر اکسیداز (DAB Thermo Fisher) Diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride حاوی ۲۰ میکرولیتر H_2O_2 به آن اضافه گردید. در اثر واکنش DAB و پراکسیداز روی کاغذ نیتروسولوز و مشاهده رنگ قهوه‌ای حاصل از واکنش آنتی‌بادی اختصاصی با پروتئین، حضور باند پروتئین مدنظر تأیید شد (۱۶، ۱۸).

فعالیت ضد میکروبی (حداقل غلظت بازدارندگی MIC): اثر ضد میکروبی پروتئین هیبریدی به‌دست آمده، از طریق تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مطالعه گردید. برای این منظور، رقت‌های متوالی از پلی پپتید (از غلظت ۱۵۶ الی $13/4 \mu\text{g/ml}$) تهیه و به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی استریل افزوده می‌شود. باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* سویه استاندارد ATCC27853 و سویه کلینیکی مقاوم ایزوله شده در کلینیک طوس و *Escherichia coli* سویه استاندارد ATCC25922 و سویه کلینیکی مقاوم برای مطالعه اثر پپتید آنتی‌میکروبیال بر سویه استاندارد و مقاوم انتخاب گردید و در محیط کشت Mueller Hinton کشت شبانه داده شد و سپس با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵ میلی‌لیتر محیط تازه، تا رسیدن به فاز لگاریتمی (OD 600nm 0.6) کشت گردید؛ پس از آن، با استفاده

استفاده گردید. برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها از آزمون Levene و از آزمون one way ANOVA و LSD و post-hoc (در شرایط برابری واریانس‌ها) و آزمون Games-Howell (در شرایط واریانس‌های نامساوی) برای مقایسه MIC پلی‌پپتیدهای مورد مطالعه استفاده شد (۱۳، ۱۶).

اثر سمیت پپتید بر سلول‌های یوکاریوتی: مطابق استاندارد ISO10993-5 و به سه روش آزمون NRU، آزمون CFU و آزمون MTT و آزمون XTT انجام می‌گیرد. متداول‌ترین روش در ارزیابی سمیت سلولی، سنجش بقای سلولی به روش MTT یا (۳-۴، ۵، ۵-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide است. رده سلولی MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در فلاسک کشت سلولی ۲۵ میلی لیتر دارای محیط DMEM حاوی ۱۰٪ Fetal FBS (bovine serum) حاوی آنتی بیوتیک (۱۰۰ u/ml) پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین) در ۵٪ CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت گردید. پس از ۴۸ ساعت و تشکیل یک لایه سلولی بر دیواره فلاسک، سلول‌ها دوباره پاساژ داده شد و دوباره پس از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایه سلول‌ها، به وسیله تیمار ملایم با تریپسین از دیواره کنده شد و با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه، با تخلیه سوپرناتانت، تریپسین از سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها دوباره در محیط کشت بالا حل شد و پس از اطمینان از viability سلول‌ها از طریق رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به میزان ۳۰۰۰ در ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک میکروپلیت (۹۶ چاهک تخت مخصوص کشت سلولی) توزیع گردید (۲۰). پس از ۲۴ ساعت و اطمینان از رشد سلول‌ها و اتصال آن‌ها به دیواره، محیط کشت داخل چاهک‌ها از طریق مکش تخلیه شد و غلظت‌های مختلف هریک از پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی (رق‌های متوالی با نسبت یک‌دوم رقیق‌شده در محیط

کشت آماده مطابق بالا) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید. همین عملیات بعد از ۲۴ ساعت در میکروپلیت‌های جدید تکرار شد و به این ترتیب، سلول‌های پلیت روز اول به مدت ۴۸ ساعت و سلول‌های پلیت روز دوم به مدت ۲۴ ساعت، با پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی در تماس قرار گرفتند. در روز سوم، محلول محیط حاوی پپتیدها از چاهک‌ها تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی MTT با غلظت 0.5 mg/ml به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂، کریستال‌های formazan با افزودن ۱۰۰ µl DMSO به صورت محلول در آمد و میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید و با تعیین نسبت جذب نوری هر نمونه به جذب نوری نمونه کنترل منفی (viability ۱۰۰ درصد)، نسبت بقای سلول‌ها محاسبه شد (۱۲) و غلظتی از پپتید که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها زنده بودند، به عنوان غلظت IC₅₀ گزارش شد. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. با استفاده از درون‌یابی مقادیر MIC برای همه تکرارها تعیین گردید و آنالیزهای آماری روی این مقادیر انجام شد. از منحنی Box-Plot برای تشخیص داده‌های پرت (Outlier) و از آزمون Shapiro-Wilk برای بررسی توزیع نرمال نتایج MIC استفاده گردید. برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها از آزمون Levene و از آزمون one way ANOVA و LSD و post-hoc (در شرایط برابری واریانس‌ها) و آزمون Games-Howell (در شرایط واریانس‌های نامساوی) برای مقایسه IC₅₀ پلی‌پپتیدهای مورد مطالعه استفاده شد (۱۳).

یافته‌ها

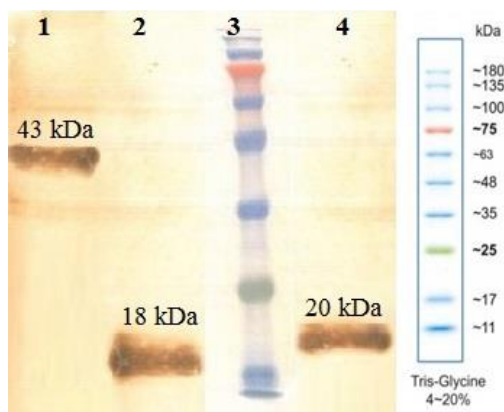
وسترن بلات برای تأیید بیان پروتئین هدف. با توجه به اینکه در سکانس‌های پروتئین‌های مدنظر دنباله هیستیدینی تعبیه شده بود، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی صورت گرفت. تطابق باندهای مشاهده شده پس از مرحله القای باکتری با باندهای آزمون

استفاده شد. در همه موارد $P \text{ value} > 0.05$ و در نتیجه، توزیع نتایج نرمال بود. با توجه به اینکه در هیچ یک از غلظت‌های آزمون MTT پلی‌پپتیدها، میزان سلول‌های زنده به کمتر از ۵۰ درصد افت نکرد (IC50)، برای بررسی و مقایسه میزان سمیت پلی‌پپتیدها، غلظت حداکثر غلظت استفاده شده آن‌ها (۱۲۵ μM) انتخاب شد و نتایج میزان سلول‌های زنده در تماس با این غلظت از لحاظ آماری ارزیابی گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف نتایج این غلظت، از آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسه اثر زمان بر میزان بقای سلولی، برای هر یک از پلی‌پپتیدها به صورت جداگانه بین داده‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون Independent T- test استفاده گردید. $P \text{ value} < 0.05$ بیانگر معنا دار بودن اختلاف میزان سمیت توالی هیبریدی با توالی‌های تترامر، S3 و SΔ3 بود. میزان بقای سلولی پس از تماس با ۱۲۵ میکرومول از هر یک از توالی‌ها در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.

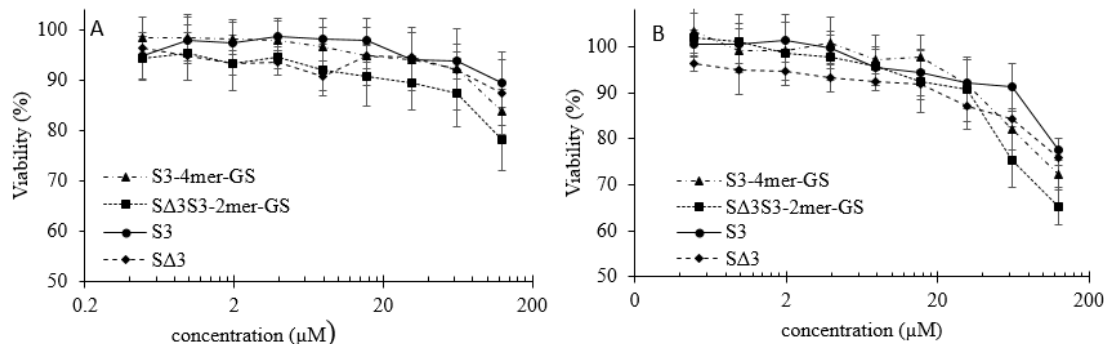
و سترن، بیان پروتئین هدف را تأیید می‌کند (شکل شماره ۱).
 نتایج آزمون MTT: آزمون MTT با رده سلولی MDA-MB-231 در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. در هر یک از میکروپلیت‌ها، میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک از جذب نوری هر یک از چاهک‌ها کسر گردید. در هر پلیت، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل نیز به عنوان Abs control در نظر گرفته و درصد بقای سلولی از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ Cell Survival} = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blank}})} * 100$$

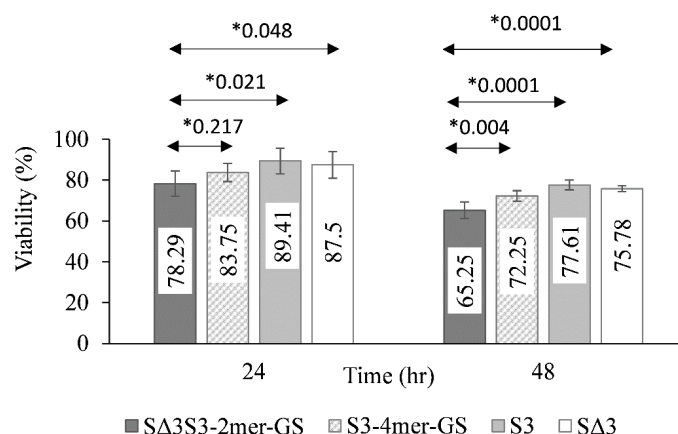
شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همه پپتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند که نشان‌دهنده خاصیت سمیت اندک این پپتیدها در حالت استاندارد و موتانت بر سلول‌ها است.
 از آزمون شاپیرو برای ارزیابی نرمال بودن توزیع نتایج



شکل ۱. ایمونوبلاتینگ با استفاده از دنباله هیستیدینی؛ شماره ۱. نمونه پروتئینی کنترل مثبت حاوی دنباله هیستیدینی (۴۳ کیلوالتون)؛ شماره ۲. پروتئین تترامر (تقریباً ۱۸/۳ کیلوالتون)؛ شماره ۳. مارکر پروتئینی؛ شماره ۴. هیبریدی (تقریباً ۲۰/۷ کیلوالتون)



شکل ۲. نمودار تغییرات میزان بقای سلولی به ازای غلظت‌های مختلف هر یک از پلی‌پپتیدها در زمان ۲۴ (A) و ۴۸ ساعت (B)



شکل ۳. مقایسه میزان بقای سلولی در ۲۴ و ۴۸ ساعت

جدول ۱. میزان بقای سلولی در غلظت‌های فعال ضد میکروبی هریک از توالی‌ها

AMP	Mw(Da)	MIC _{GM} (μg/ml)	MIC _{GM} (μM)	Viability 48 hr (%)	Cytotoxicity 48 hr (%)
SΔ3S3-2mer-GS	20680.59	47.29	2.29	98.3	1.7
S3-4mer-GS	20540.23	71.84	3.5	99.2	0.8
S3	3891.42	108.36	27.85	92.5	7.5
SΔ3	3961.5	65.59	16.56	91.4	8.6

بر اساس شکل شماره ۳ ثابت می‌گردد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همه پپتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند و سمیت این پپتیدها در حالت استاندارد و موتانت بر سلول‌ها یوکاریوت اندک است. از آنجا که غلظت ۱۲۵ میکرومول بسیار بیشتر از غلظت فعال ضد میکروبی توالی‌ها بود؛ بنابراین، میزان سمیت توالی‌ها در غلظت میانگین بازدارنده رشد میکروبی محاسبه گردید. برای این منظور، مقادیر MIC میانگین هندسی به دست آمده از مرحله آزمون ضد میکروبی، با استفاده از وزن مولکولی هریک از توالی‌ها به میکرومول بر میلی‌لیتر تبدیل شد؛ سپس با استفاده از درون‌یابی روی منحنی‌های بقای سلولی، میزان بقای سلولی در این غلظت‌ها محاسبه گردید (جدول شماره ۱).

نتایج آزمون فعالیت ضد میکروبی: تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از توالی‌های هیبریدی، تترامر و پپتیدهای سازنده آن‌ها، روی رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* (سویه استاندارد

ATCC27853) و سویه کلینیکی مقاوم ایزوله شده در کلینیک طوس *E. coli* (سویه استاندارد ATCC25922) و سویه کلینیکی مقاوم، به صورت تکرارهای چهارتایی بررسی شد. در هر میکروپلیت، میانگین چاهک‌های بلانک از میانگین چاهک‌های حداکثر رشد کسر گردید و میزان بازدارندگی بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Growth Inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD maximum growth} - \text{OD sample})}{\text{OD maximum growth}} * 100$$

منحنی بازدارندگی برحسب غلظت پلی‌پپتید رسم گردید. نتایج مربوط به اثر بازدارندگی هریک از پلی‌پپتیدها روی سویه‌های یادشده در شکل شماره ۴ آمده است. نتایج، میانگین تکرار ۴ آزمایش هستند و انحراف استاندارد نتایج به صورت error bar نمایش داده شده است. با استفاده از درون‌یابی، غلظتی از توالی‌ها که باعث کاهش ۹۰ درصدی رشد باکتری‌های مدنظر گردید، به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد.

در شکل شماره ۴، با توجه به میانگین نتایج و با استفاده از روش درون‌یابی، میزان بازدارندگی ۹۰ درصد

بر اساس شکل شماره ۳ ثابت می‌گردد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همه پپتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند و سمیت این پپتیدها در حالت استاندارد و موتانت بر سلول‌ها یوکاریوت اندک است.

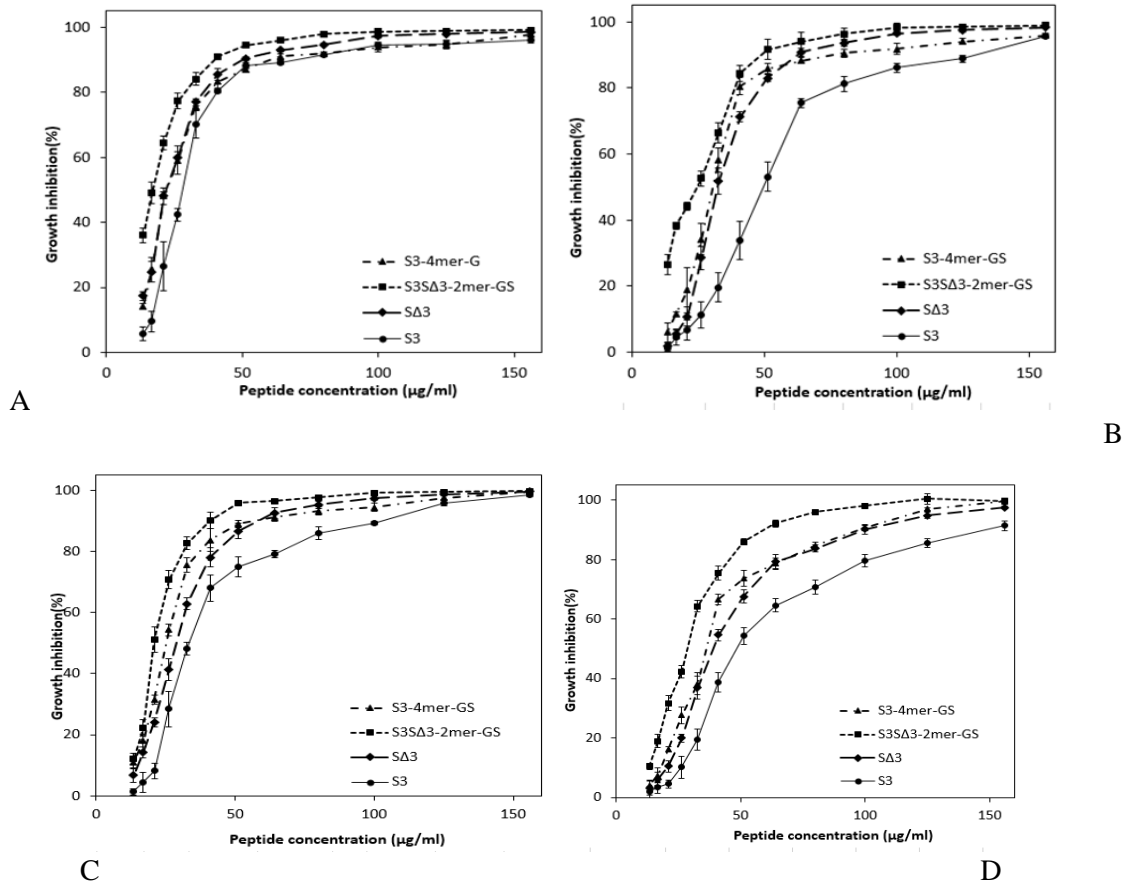
از آنجا که غلظت ۱۲۵ میکرومول بسیار بیشتر از غلظت فعال ضد میکروبی توالی‌ها بود؛ بنابراین، میزان سمیت توالی‌ها در غلظت میانگین بازدارنده رشد میکروبی محاسبه گردید. برای این منظور، مقادیر MIC میانگین هندسی به دست آمده از مرحله آزمون ضد میکروبی، با استفاده از وزن مولکولی هریک از توالی‌ها به میکرومول بر میلی‌لیتر تبدیل شد؛ سپس با استفاده از درون‌یابی روی منحنی‌های بقای سلولی، میزان بقای سلولی در این غلظت‌ها محاسبه گردید (جدول شماره ۱).

نتایج آزمون فعالیت ضد میکروبی: تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از توالی‌های هیبریدی، تترامر و پپتیدهای سازنده آن‌ها، روی رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* (سویه استاندارد

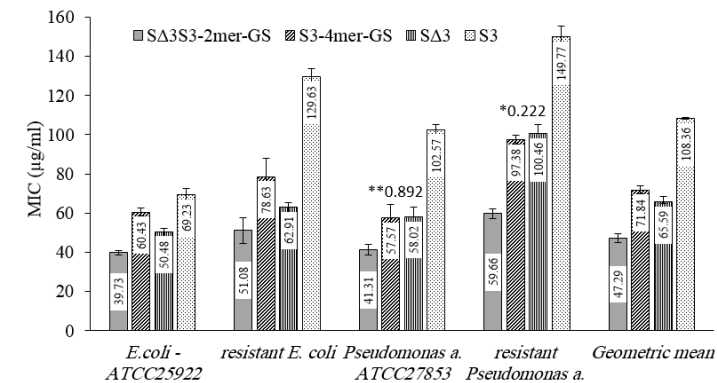
بیانگر اثر مثبت بیان هیبریدی روی فعالیت ضد میکروبی این توالی است.

شکل شماره ۵ بیان می کند که موتانت های مشتق از S3 در غلظت های پایین تری، خاصیت ضد میکروبی نسبت به آن دارند و در حالت SΔ3S3-2mer-GS در پایین ترین اندازه است.

محاسبه گردید و به عنوان MIC بر حسب $\mu\text{g/ml}$ در شکل شماره ۵ گزارش شد. برای مقایسه کلی اثر بیان هیبریدی از میانگین هندسی (Geometric mean) استفاده گردید. بر اساس غلظت میانگین هندسی، MIC توالی هیبریدی به ترتیب از MIC توالی های SΔ3، تترامر و S3 به ترتیب ۲۸ درصد، ۳۴ درصد و ۵۷ درصد کمتر بود که این امر



شکل ۴. A. منحنی بازدارندگی رشد پلی پپتیدها روی رشد باکتری *E. coli* ATCC 25922؛ B. منحنی بازدارندگی رشد پلی پپتیدها بر رشد باکتری *E. coli* کلینیکال مقاوم؛ C. منحنی بازدارندگی رشد پلی پپتیدها روی رشد باکتری *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC27853؛ D. منحنی بازدارندگی رشد پلی پپتیدها بر رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* کلینیکال مقاوم



شکل ۵. حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروبی علیه باکتری های گرم منفی

بحث و نتیجه گیری

از آنجاکه باکتری‌های مقاوم به دارو به علت تجویز بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها ظهور کرده‌اند، به کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز است و پپتیدهای ضد میکروبی با آثار جانبی کمتر و تأثیر بالاتر و همچنین ایجاد نکردن مقاومت در باکتری می‌توانند جایگزین ارزشمندی را ارائه دهند. پپتیدهای ضد میکروبی عناصر اصلی سیستم ایمنی ذاتی هستند. این پپتیدها، پپتیدهای کوچکی هستند که به علت حضور لیزین و یا آرژینین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند که عامل فعالیت ضد میکروبی مستقیم این پپتیدها است (۲۱). غشای میکروارگانیزم‌هایی نظیر باکتری و قارچ، فسفولیپیدهایی با بار منفی در طرف خارجی غشا دارند که پپتیدهای ضد میکروبی در اثر تعامل با این غشای دارای بار مخالف، در آن اختلال ایجاد می‌کند و در نتیجه، موجب از بین رفتن میکروب‌ها می‌گردند (۱). یکی از این روش‌های کاربردی برای استفاده از این پپتیدها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک هیبرید و ترکیب کردن پپتیدهای ضد میکروبی با یکدیگر است که می‌تواند باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی، افزایش محدوده فعالیت ضد میکروبی روی ارگانیزم‌های مختلف یا افزایش قدرت تمایلی آن‌ها به اندوتوکسین شود، بدون اینکه خاصیت سمیت آن‌ها افزایش چشمگیری داشته باشد (۲۲). بیان نو ترکیب پپتیدهای ضد میکروبی به‌صورت مولتی‌مر یا هیبرید، نوع خاصی از بیان فیوژن است که امکان دسترسی به مقادیر بیشتری از پپتیدهای ضد میکروبی را فراهم می‌کند (۱۶). دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بیان ژن پپتید S3 به‌صورت مونومر، دایمر، تترامر و اکتامر دریافتند که فرم تترامر آن بیشترین میزان بیان را دارد (۲۳). درباره پپتید ضد میکروبی S3 گزارش شده است که از میان حالات دایمر، تترامر و اکتامر، بیشترین فعالیت مربوط به فرم تترامر این پپتید است (۲۴). نوآوری تحقیق حاضر در این است که برای افزایش خاصیت ضد میکروبی پلی‌پپتید S3، از روش هیبریداسیون استفاده شد، به‌طوری‌که دو واحد پپتید S3 سازنده فرم

تترامر، با پپتید ضد میکروبی SΔ3 جایگزین گردید. اتصال‌دهنده‌های پپتیدی گلاسیسین - سرین که در گروه اتصال‌دهنده‌های پپتیدی منعطف دسته‌بندی می‌شود، فضای بیشتری را برای عملکرد دمین‌ها در اختیار آن‌ها قرار می‌دهد و سبب بهبود تاخوردگی پروتئین می‌گردد که خود می‌تواند ایده جدیدی برای استفاده از انواع اتصال‌دهنده و مقایسه کارایی آن‌ها در آینده باشد (۲۵). باغ بهشتی و همکاران از این اتصال‌دهنده‌های پپتیدی در بیان نو ترکیب پپتید S3 استفاده کردند و مشاهده نمودند که این لینکر در مقایسه با اتصال‌دهنده‌های پپتیدی سخت آسپارتیک اسید- پرولین، باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی پروتئین به‌دست آمده گردید (۱۶). در این تحقیق، اثر بیان هیبرید پپتیدهای SΔ3 و S3 با لینکر گلاسیسین سرین مطالعه شد و برای مطالعه اثر هیبریداسیون، خاصیت ضد میکروبی و سمیت آن با حالت تترامر S3 مقایسه گردید؛ بنابراین، دو پلی‌پپتید هیبرید و تترامر از نظر توالی لینکر بین تکرارها و تعداد اسید آمینه‌ها کاملاً یکسان بودند و تفاوت‌های مشاهده‌شده در فعالیت بیولوژیکی آن‌ها، صرفاً مربوط به جایگزینی دو پپتید S3 با پپتید SΔ3 است. برای این منظور، بیان ژن مربوط به توالی‌های هیبرید و تترامر، پس از سنتز و تکثیر به باکتری *E. coli* BL21 منتقل گردید و پس از القای باکتری با IPTG، بیان پروتئین‌های هدف با استفاده از آزمون‌های SDS-PAGE و وسترن (علیه دنباله هیستیدینی) انجام و بیان آن‌ها تأیید شد. پس از مرحله بیان در برخی از کلون‌های بیان‌کننده پلی‌پپتید هیبرید و تترامر، باندهای سنگین‌تر از پروتئین هدف مشاهده گردید که با انجام آزمون وسترن، حضور دنباله هیستیدینی در این باندها تأیید شد. شکست باندهای دایمر در حالت احیای آزمون SDS-PAGE و پررنگ‌تر شدن باند مربوط به پلی‌پپتید منومر، بیانگر حضور باندهای دی‌سولفیدی در این پروتئین‌ها است که به‌نظر می‌رسد به سبب منعطف و طویل بودن لینکر گلاسیسین سرین از نظر فضایی، امکان نزدیک شدن سیستئین از یک مونومر با مونومر دیگر و در نتیجه، تشکیل پیوند دی‌سولفیدی میان

F17 (۱۴) نیز مشاهده شد. در بیان نو ترکیب پپتیدهای ضد میکروبی اعم از بیان فیوژن یا مولتی مر، بررسی اثر سمیت پروتئین به دست آمده یکی دیگر از نکات حائز اهمیت است. همان طور که نشان داده شد، پس از ۲۴ ساعت تماس، میزان بقای سلولی در مورد پروتئین هیبرید از پپتیدهای سازنده آن‌ها (S3 و SΔ3) کمتر است و در نتیجه، سمیت توالی هیبریدی در غلظت ۱۲۵ میکرومول از پپتیدهای تشکیل دهنده آن حداکثر حدود ۱۱ درصد بیشتر است؛ اما اختلاف حدود ۵ درصد در مقادیر بقای سلولی توالی هیبریدی و تترامر معنا دار نبود و به عبارت دیگر، سمیت این توالی‌های هیبریدی و تترامر تقریباً یکسان است؛ اما پس از ۴۸ ساعت تماس، اختلاف مشاهده شده میان مقادیر بقای سلولی در مورد توالی هیبرید با توالی‌های تترامر و پپتیدهای سازنده معنا دار بود و این بدین معنی است که میزان سمیت توالی هیبریدی تقریباً به ترتیب ۵، ۱۲ و ۱۰ درصد بیشتر از سمیت توالی تترامر، S3 و SΔ3 بود. تنها تفاوت سمیت حالت تترامر با منومرهای سازنده آن (S, SΔ3) معنی دار بود. همان طور که نشان داده شد، میزان بقای سلولی برای هر یک توالی‌ها با افزایش زمان، کاهش پیدا می‌کرد؛ بنابراین، سمیت توالی‌ها به زمان نیز وابسته بود و با افزایش زمان تماس، افزایش می‌یافت. تأثیر بیان هیبرید دو پپتید ضد میکروبی S3 و SΔ3 در سوبه *E. coli* BL 21 (DE3) بیان گردید و با میزان بیان و فعالیت بیولوژیک پروتئین نو ترکیب تترامر S3 مقایسه شد. مقایسه میزان بیان پروتئین حالت پپتید با حالت تترامر بیانگر این بود که افزایش بار مثبت در پروتئین هیبرید، برای باکتری میزان اثر سمیت ایجاد نمی‌کند. مقایسه فعالیت ضد میکروبی این دو پروتئین بیانگر اثر مثبت بیان هیبرید در افزایش خاصیت ضد میکروبی پروتئین حاصله بود و هر چند میزان سمیت پروتئین هیبرید برای سلول‌های یوکاریوتی، در مقایسه با سمیت پروتئین تترامر تاحدی افزایش داشت؛ اما در غلظت فعال این پروتئین (میانگین هندسی حداقل غلظت لازم برای بازدارندگی رشد میکروبی MIC_{GM}) این افزایش سمیت ناچیز بود؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که

دو منومر فراهم شده است و پروتئین به حالت دimer تبدیل می‌گردد. نتایج مطالعات لی و همکاران در سال ۲۰۰۴، این فرضیه را تأیید می‌کند. آنان در مطالعه خود، تشکیل باند دی‌سولفیدی میان منومرهای پپتید S3 و در نتیجه، تشکیل فرم دimer این پپتید را تأیید کردند. آنان از طریق جایگزینی سیستمین شماره ۲۷ با سرین در توالی پپتید S3 و مقایسه قدرت اتصال موتانت حاصله به LPS دریافتند که قدرت اتصال پپتید S3 در حالت وجود باندهای دی‌سولفیدی، به مراتب بیشتر از حالت موتانت بدون این پیوند است (۲۶). برای بررسی اثر بیان هیبرید پپتیدهای S3 و SΔ3، میانگین غلظت بازدارندگی رشد میکروبی پروتئین حالت پپتید با مقدار متناظر آن از پروتئین تترامر S3 مقایسه گردید. همان طور که نشان داده شد، مقدار MIC_{GM} توالی هیبریدی از مقادیر متناظر مربوط، نسبت به حالت بیان تترامر و پپتیدهای سازنده آن شامل SΔ3 و S3 به ترتیب باعث بهبود ۳۴، ۲۸ و ۵۷ درصدی بهبود یافته بود. SΔ3 واریانته از پپتید S3 است که از طریق جایگزینی دو اسید آمینه گلوتامیک اسید و گلايسين باليزين، بار مثبت خالص آن ۳ بار افزایش یافته و این امر باعث بهبود خاصیت اتصال آن به لیپوپلی ساکارید دیواره باکتری‌های گرم منفی گردیده است (۲۷). در تحقیق حاضر، بیان هیبرید توالی S3 و SΔ3 باعث افزایش بار مثبت پروتئین حاصله (۶+) در مقایسه با حالت تترامر S3 شد. افزایش بار مثبت پپتیدهای ضد میکروبی عموماً باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی می‌گردد؛ به عنوان مثال، گزارش شده است که تعویض اسید آمینه گلايسين در توالی پپتید ضد میکروبی alyteserin-2a باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی آن گردید (۲۸). به طور مشابه، در واریانت جدیدی از پپتید S3، حذف بار منفی از توالی این پپتید، به افزایش بار مثبت و در نتیجه، بهبود خاصیت ضد میکروبی آن منجر شد (۱۳). در تحقیق دیگری، افزودن اسید آمینه لیزین به پپتید ضد میکروبی magainin باعث افزایش بار مثبت و خاصیت ضد میکروبی واریانت جدید گردید (۲۹). همین اثر در سایر پپتیدهای ضد میکروبی نظیر pseudin-2 (۳۰)، temporine (۱۵) و

بیان هیبرید پلی پپتید ضد میکروبی S3 و SΔ3 راهکار مناسبی برای دستیابی به مقادیر مناسب از پروتئین ضد میکروبی با خاصیت ضد میکروبی ارتقایافته است.

مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق

این مطالعه فاقد کار آزمایی بالینی بوده و کد اخلاق نیاز

نداشت.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تضاد منافی در این

References

- Zasloff M. Antimicrobial peptides innate immunity and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol*2007; 18:2810-6. doi.10.1681/ASN.2007050611
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host defense peptides as new anti infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006; 24:1551-7. doi.10.1038/nbt1267
- Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski L, Silva I, Kyaw C. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol*2013; 4:353. doi.10.3389/fmicb.2013.00353
- Kotsianidis I, Kokkinou D, Siapati E, Miltiades P, Lamprianidou E. Identification of a chemoresistant oxidative state low leukemic subpopulation in cd34⁺ human acute myeloid leukemia cell cycle analysis sorted subsets were stained with Ki67. *J Stem Cell Res Ther* 2014;4:9. doi. 10.4172/2157-7633.100023
- Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* a review. *Protein Exp Pur*2011; 80:260-7. doi.10.1016/j.pep.2011.08.001
- Yusupova YR, Skripnikova VS, Kivero AD, Zakataeva NP. Expression and purification of the 5'-nucleotidase YitU from *Bacillus* species: its enzymatic properties and possible applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*2020; 104:2957-72. doi.10.1007/s00253-020-10428-y
- Rao X, Hu J, Li S, Jin X, Zhang C, Cong Y, et al. Design and expression of peptide antibiotic hpab-β as tandem multimers in *Escherichia coli*. *Peptides*2005; 26:721-9. doi. 10.1016/j.peptides.2004.12.016.
- Leptihn S, Guo L, Frecer V, Ho B, Ding JL, Wohland T. One step at a time: Action mechanism of Sush1 antimicrobial peptide and derived molecules. *Virulence* 2010; 1:42-4. doi.10.4161/viru.1.1.10229
- Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers property design and functionality. *Adv Drug Deliver Rev*2013; 65:1357-69. doi.10.1016/j.addr.2012.09.039
- Lorenzini DM, Silva JR PI, Fogaça AC, Bulet P, Daffre S .Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* 2003; 27:781-91. doi.10.1016/s0145-305x(03)00058-2
- Sperstad SV, Haug T, Vasskog T, Stensvag K. Hyastatin a glycine rich multi domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab hemocytes. *Mol Immunol* 2009; 46:2604-12. doi.10.1016/j.molimm.2009.05.002
- Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an αhelical antimicrobial peptide with improved cell selective and potent anti biofilm activity. *Sci Rep*2016; 6:27394. doi. 10.1038/srep27394 2016
- Sepahi M, Ahangari Cohan R, Hadadian S, Norouzian D. Effect of glutamic acid elimination substitution on the biological activities of S3 cationic amphiphilic peptides. *Pre Biochem Biotechnol*2020; 50:664-72. doi.10.1080/10826068.2020.1725772
- Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide membrane interactions. *J Biol Chem*2012; 287:7738-45. doi.10.1074/jbc.M111.303602
- Shang D, Li X, Sun Y, Wang C, Sun L, Wei S, et al. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide temporin1CEb from Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79:653-62. doi.10.1111/j.1747-0285.2012.01363.x
- Baghbeheshti S, Hadadian S, Eidi A, Pishkar L, Rahimi H. Effect of flexible and rigid linkers on biological activity of recombinant tetramer variants of s3 antimicrobial peptide. *Int J Pept Res Ther*2021; 27:457-62. doi.10.1007/s10989-020-10095-7
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. 2th ed. *Proteom Prot Handbook Totowa New Jersey Springer Publication*. 2005; P. 571-607. doi.10.1385/1-59259-890-0:571.
- Maboudi K, Hosseini SM, Sepahi M, Yaghoubi H, Hadadian S. Production of erythropoietin specific polyclonal antibodies. *Iranian J Biotechnol*2017; 15:50. doi. doi.org/10.15171/ijb.1413
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration of antimicrobial substances. *Nat Prot*2008; 3:163-75. doi. 10.1038/nprot.2007.521
- Burns KE, McCleerey TP, Thevenin D. PH selective cytotoxicity of pHLIP antimicrobial peptide conjugates. *Sci Rep*2016; 6:28465. doi.10.1038/srep28465
- Cirac A, Torne M, Badosa E, Montesinos E, Salvador P, Feliu L, et al. Rational design of

- cyclic antimicrobial peptides based on bpc 194 and bpc198. *Molecules* 2017; 22:1054. doi. 10.3390/molecules22071054
22. Almaaytah A, Qaoud MT, Abualhajaa A, Albalas Q, Alzoubi KH. Hybridization and antibiotic synergism as a tool for reducing the cytotoxicity of antimicrobial peptides. *Inf Drug Res* 2018; 11:835. doi.10.2147/IDR.S166236
 23. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection from limulus amebocyte lysate to recombinant factor c endotoxins structure. *Func Rec Springer Publication*. 2010. P. 187-208. doi. 10.1007/978-90-481-9078-2_9.
 24. Rezaei S, Hadadian S, Khavarinejad RA, Norouzian D. Recombinant tandem repeated expression of s3 and sδ3 antimicrobial peptides. *Rep Biochem Mol Biol* 2020; 9:348. doi. 10.29252/rbmb.9.3.348
 25. Sabourin M, Tuzon CT, Fisher TS, Zakian VA. A flexible protein linker improves the function of epitope tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2007; 24:39-45. doi. 10.1002/yea.1431
 26. Li P, Wohland T, Ho B, Ding JL. Perturbation of lipopolysaccharide micelles by sushi 3 antimicrobial peptide the importance of an intermolecular disulfide bond in s3 dimer for binding, disruption, and neutralization of lps. *J Biol Chem* 2004; 279:50150-6. doi. 10.1074/jbc.M405606200
 27. Yau YH, Ho B, Tan NS, Ng ML, Ding JL. High therapeutic index of factor C Sushi peptides: potent antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Age Chemother* 2001; 45:2820-5. doi.10.1128/AAC.45.10.2820-2825.2001
 28. Conlon JM, Mechkarska M, Arafat K, Attoub S, Sonnevend A. Analogues of the frog skin peptide alyteserin-2a with enhanced antimicrobial activities against Gram-negative bacteria. *J Pept Sci* 2012; 18:270-5. doi.10.1002/psc.2397
 29. Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 2001; 501:146-50. doi. 10.1016/S0014-5793(01)02648-5
 30. Pal T, Sonnevend A, Galadari S, Conlon JM. Design of potent, non toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide pseudin2. *Regul Pept* 2005; 12 :85-91. doi. 10.1016/j.regpep.2005.01.015