

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 پیتید S3 طبیعی با منشأ خرچنگ نعل اسبی، با موئات های حاصل از آن

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

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

^۲ گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فناوری‌های نوین، انتیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
---------------	-------

مقدمه: پیتیدهای ضد میکروبی (AMP) ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی هستند که به سبب ظهور مقاومت باکتری‌های

بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه و بررسی می‌شوند. در مطالعه حاضر، آثار سمیت و ضد میکروبی دو پیتید مونومری S3

طبیعی به عنوان استاندارد و SΔ3 با هیبرید S3-SΔ3 و تترامر S3 بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: هیبرید پروتئینی (SΔ3S3-2mer-GS) S3- SΔ3 و پروتئین تترامر S3 (S3-4mer-GS) در باکتری

E.coli BL21 (DE3) بیان شدند؛ سپس وجود پیتیدهای موئات تأیید و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها با مونومرهای S3 و

SΔ3 مطالعه گردید. درنهایت، سمیت تترامر و هیبرید ساخته شده روی رده سلولی MDA-MB-231 ارزیابی و مقایسه شد.

یافته‌ها: در بیان پروتئین نوترکیب، افزایش بار مثبت در پروتئین هیبرید برای باکتری میزان اثر سمیت ایجاد نمی‌کند. میزان

سمیت هیبرید در مقایسه با تترامر برای سلول‌های پوکاربیوتی افزایش کمی داشت؛ اما در غلظت فعال این پروتئین، این افزایش

ناچیز بود. میزان بقای سلولی در مورد هیبرید از S3 و SΔ3 کمتر است؛ اما میزان بقای سلولی برای هریک از توالی‌ها، با

افزایش زمان کاهش پیدا می‌کرد. علاوه بر این، بازدارندگی رشد میکروبی هیبرید نسبت به تترامر، S3 و SΔ3 بهبود یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به میزان بیان مناسب و افزایش فعالیت ضد میکروبی و سمیت سلولی اندک، پیتید هیبرید

هیبرید S3 و SΔ3 می‌تواند به عنوان یک استراتژی تولید مؤثر برای به دست آوردن AMP‌ها در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: پیتید تترامر S3، هیبرید پروتئینی S3-SΔ3، خرچنگ نعل اسبی، فاکتور C، پیتیدهای ضد میکروبی

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

نویسنده مسئول:

Shahin Hadadian

گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه

تحقیقات فناوری‌های نوین، انتیتو

پاستور ایران، تهران، ایران

Email:

hadadian@yahoo.com

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

نعل اسبی، با موئات های حاصل از آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان (۴)۲۹؛ ۱۴۰۰: ۷۳-۶۰.



مشابهی در تخریب غشای این نوع سلول‌ها داشته باشدند (۳). بهسب آنکه پیتیدهای ضدمیکروبی از مولکول‌های مهم اینمی 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 ضدمیکروبی 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 کشنده‌گی پیتید ضروری است که از طریق تخریب غشا و یا تخریب‌های درونسلولی اعمال می‌شوند (۴).

به طور کلی سنتر پیتیدهای فرایند پیچیده، پرهزینه و زمان‌بری است و جداسازی پیتیدهای ضدمیکروبی 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 اصلاح شده‌ای دارند که با پروتئین‌های ساخته شده توسط ریبوزوم‌ها متفاوت‌اند. در حال حاضر، روش‌های تولید نوترکیب به سبب بیان پروتئینی اندک و حساسیت به پروتئین‌های هیریدی و مولتی مر در عمل، روش‌هایی اقتصادی به نظر می‌آیند؛ اما درباره پیتیدهای خطی S1 با 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 سنتر فاز جامد این پیتیدها استفاده شده و تنها گزارش تولید نوترکیب آن‌ها، مربوط به بیان مولتی مر S3 در میزان E.coli BL21 (DE3) است (۶). راثو و همکاران نیز در

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 مرگ و میر و بروز آثار جانبی داروهای موجود شده است، ضرورت مطالعه و تولید داروهای آنتی‌میکروبیال سنتیک و طبیعی را دوچندان کرده است؛ از این‌رو، بررسی آثار پیتیدهای سنتیک ضدباکتریایی می‌تواند راه را برای به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید هموار سازد. پیتیدهای ضدمیکروبی اجزای مهمی از دستگاه اینمی بسیاری از مهره‌داران و بی‌مهرگان هستند و در اولین خط دفاعی می‌بینند بر ضد تهاجم میکروارگانیسم‌ها حضور دارند. سمیت این پیتیدها به علت ظرفیت مداخله‌گر آن‌ها در غشا میکروبی است که با ایجاد منفذ در غشا، به مرگ سلولی می‌انجامد. پیتیدهای ضدمیکروبی پیتیدهای کوچکی هستند که به سبب حضور لیزین و یا آرژین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند. خاصیت اصلی ساختاری پیتیدهای ضدمیکروبی که ناشی از بار مثبت و خاصیت آمفی‌پاتیک آن‌هاست، عامل فعالیت ضدمیکروبی مستقیم این پیتیدها است (۱). پیتیدهای ضدمیکروبی دو ویژگی جذاب دارند: اول اینکه فعالیت ضدمیکروبی 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)؛ درنتیجه، این پیتیدها به واسطه قابلیت کاربرد آن‌ها، به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید، منفعت بسیار دارند. سازوکار فعالیت پیتیدهای ضدمیکروبی، توانایی آن‌ها در تخریب غشای سلولی است. پیتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند با میکروارگانیسم‌ها به وسیله نیروهای الکترواستاتیک، میان اسیدهای آمینه مثبت خود با اسیدهای آمینه منفی روی سطح میکروارگانیسم‌ها برهمنکش کنند. از آنجاکه بار منفی سطحی غشای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی بیشتر است، به نظر می‌رسد که پیتیدهای ضدمیکروبی سازوکار

سفارش داده شد. سازه های ژنی در وکتور (+) pET-26b(+) و دریافت گردید. برای سهولت، توالی GS³-mer-GS³-mer-GS³-GS⁴S به ترتیب با نام های توالی هیبریدی و تترامر نامیده می شوند.

تکثیر پلاسمید، تخلیص و تهیه سلول های مستعد باکتری / E. coli TOP10F برای تکثیر پلاسمید های مدنظر استفاده شد. به این منظور، پس از تازه کردن محیط کشت این باکتری، وکتور های 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 فرایند تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید آگارز ۱ درصد (RPI) برده شدند. برای انتقال سازه 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 میکرو لیتر برداشته و با لوب 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 گرمگذاری شد. از هر یک از کلنی های رشد یافته بر پلیت های بالا، یک کلنی برداشته و در ۵ میلی لیتر LB(LB broth Thermo Fisher) مایع از محیط کشت تلقیح گردید و در شیکر انکوپیاتور 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 سانتریفیوژ در دور ۹۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه رسوب داده و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در ۹۰۰ میکرو لیتر محلول ۰/۱ مولار از (Sigma - CaCl₂ Aldrich) سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی بخ قرار گرفت. سلولها در دور ۹۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه

سال ۲۰۰۵، پپتید خدمیکروبی hPAB- β را به صورت مولتی مر در *E.coli* BL21(DE3) بیان کردند و دریافتند که از میان حالات دیمر تا اکتامر آن، بیشترین میزان بیان در حدود ۲۷/۸ درصد مربوط به بیان ژن این پپتید به صورت تراپیم برود (۷). پپتید S Δ 3 واریانت ارتقایافته پپتید S3 است که در آن با تغییر دو اسید آمینه G9 و E11 به لیزین، بار مثبت پپتید، خاصیت خدمیکروبی و البته اثر سمت آن افزایش یافته است (۸). از سویی، تحقیقات نشان داده است که فرم‌های مولتی مر پپتید S3 نیز خاصیت خدمیکروبی دارند. لینکرهای گلایسین سرین به علت قابل انعطاف بودن و کاهش ممانعت فضایی اجزای متصل شده، باعث افزایش پایداری، فولدینگ مناسب و از همه مهم‌تر، سبب حفظ و حتی افزایش فعالیت بیولوژیکی قطعات پروتئینی متصل شده می‌گردد (۹). پپتیدهای غنی از گلایسین جداسازی شده از دستگاه‌های دفاعی موجوداتی نظیر عقرب و خرچنگ عقربی، خاصیت خدمیکروبی دارند (۱۰، ۱۱). ابتدا توالی هریک از سکانس‌ها با افروزن لینکر مدنظر، His tag و سایت انتروکینازی مشخص شد. در این مطالعه، توالی پپتیدهای مدنظر شامل یک توالی تترامر هیبریدی S3 و S Δ 3 با لینکر گلایسین سرین (S Δ 3S3-2mer-GS) (که پس از این، پروتئین هیبریدی نامیده می‌شود) و یک حالت تترامر پپتید S3 با لینکر گلایسین سرین (S3-4mer-GS) (که پس از این، پروتئین تترامر نامیده می‌شود)، به عنوان واریانت کنترل برای بررسی اثر بیان هیبریدی بودند. بر اساس تعاریف بالا، هدف اصلی این پژوهش تلاش برای طراحی و تولید موتابنت‌های مؤثرتری از این پپتید به عنوان پپتیدهای خدمیکروبی است.

مواد و روش ها

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

سانتریفیوژ 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 ۹۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از CaCl_2 سرد حل گردید (۱۶).

ترانسفورماتیون باکتری *BL21* با وکتور نوترکیب: پس از آماده شدن سلول‌های مستعد، سازه ژنی بهمنظر بیان به باکتری *E. coli* سویه (DE3) BL21 کشت می‌شود. پس از انتقال سازه‌های ژنی به سلول‌های ییانی، سلول‌های LB حاوی پلاسمید نوترکیب، از طریق کشت روى محیط آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین غربالگری گردید و کلنجی‌های غربالگری شده در محیط کشت مایع LB کشت داده شدند. پس از رسیدن کشت باکتری به OD ۰.۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، باکتری با افروزن IPTG با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار القا گردید و دوباره به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سانتریفیوژ، دیواره سلولی از طریق حل کردن پلت‌ها به نسبت ۱:۵ وزنی / حجمی در محلول لیزکنندۀ ۳۳% (Tris Sigma-Aldrich, HCL pH=7.5) استفاده از دستگاه اولتراسونیک (ده پالس ۳۰ ثانیه – توقف ۳۰ ثانیه) شکسته شد و پس از شستشو و حذف بقایای دیواره سلولی شکسته شده، اینکلولوژن بادی‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۹۰۰۰ rpm به صورت پلت جداسازی گردید و برای شستشو در بافر ۲۰ میلی مولار pH=7.5 حاوی اوره ۲ مولار tris-HCl استفاده شد و پس از سانتریفیوژ بر اساس (Urea Merck) حل شد و پس از سانتریفیوژ بر اساس شرایط بالا، سوپرنا坦ت دور ریخته و پلت‌ها جمع آوری گردید؛ سپس اینکلولوژن بادی شسته شده با استفاده از بافر ۲۰ میلی مولار pH=7.5 tris-HCl حل گردید (نسبت ۱:۵ وزنی / حجمی) و به مدت ۳۰

دقیقه در دمای ۴ درجه با همزن مغناطیسی همزدۀ شد. درنهایت، با استفاده از سانتریفیوژ، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۹۰۰۰، مایع رویی حاوی پروتئین حل شده جمع آوری گردید (۱۶).

تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمايلی یون فلزی (IMAC)، برای تخلیص هریک از توالی‌ها، یک میلی‌لیتر رزین Agarose Bead (Agarose Bead NiNTA Technologies-ABT) درون ستون (SP Fast Flow Cytiva Hitrap) ۵۰ درصد یک میلی‌لیتری ریخته شد و پس از معادل‌سازی با ۵ میلی‌لیتر بافر معادل‌سازی با شدت جریان ml/min^۱، نمونه به ستون اعمال گردید؛ سپس تا ستون با ۱۰ برابر حجم ستون از بافر معادل‌سازی 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 جمع آوری شدند (۷۶). درنهایت، 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 پیتید 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 ۱/۰ درصد آن‌ها محاسبه گردید. ضریب خاموشی پروتئین‌های تترامر و هیبرید با استفاده از توالی اسید آمینه‌های آن‌ها و با استفاده از تخمین خواص فیزیکی شیمیابی آن‌ها در سایت ExPASy به ترتیب معادل ۰/۸۸۳ و ۰/۸۸۷ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ تخمین زده شد (۱۷).

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

از سرم نمکی ستون تا رسیدن به غلظت سلولی CFU/ml $10^5 \times 5$ رقیق شد (حصول کدورت مشابه کدورت استاندارد مک فارلنده ۰/۵%). در شرایط ستون، میزان ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون در هریک از چاهک‌های ستون‌های ۲ الی ۱۰ ریخته شد. در چاهک‌های ستون شماره ۱۲ برای تست ستونی شرایط آزمون، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در چاهک‌های ۱، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از پروتئین‌های متواالی های هیبریدی و تترامر با غلظت ۳۱۲۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ (۲۰ برابر)، با استفاده از محیط کشت مولر هینتون ۱۰ برابر رقیق گردید و به غلظت ۳۱۲ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 متواالی 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 متواالی پیتیدهای چاهک‌های ستون ۱۱ به کنترل مشتبه باکتری (رشد حداکثر سویه) و چاهک‌های ستون ۱۲ به کنترل منفی باکتری (تست ستونی 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، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین (MIC) انتخاب گردید (۱۳). آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. استاندارد مک فارلنده 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 MIC برای بررسی توزیع نرمال نتایج

Semi (bio rad) Dry برای انتقال باندهای پروتئینی استفاده شد. برای جلوگیری از انتقال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها به سطح کاغذ نیتروسلولز، کاغذ به مدت O/N در بافر Bovine buffered saline (PBS Gibco) Serum Albumin (BSA Siga-Aldrich) ۵% داده شد. روز بعد، پس از ۳ بار شستشوی کاغذ با بافر PBS حاوی Tween20٪ (Tween RPI)، آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی متصل به آنزیم پراکسیداز، با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر PBS به روی کاغذ نیتروسلولز 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 Diaminobenzidine (DAB Thermo Fisher) (DAB) حاوی tetrahydrochloride (DAB) آن اضافه گردید. در اثر واکنش DAB و پراکسیداز روی کاغذ نیتروسلولز و مشاهده رنگ قهوه‌ای حاصل از واکنش آنتی‌بادی اختصاصی با پروتئین، حضور باند پروتئین مدنظر تأیید شد (۱۶، ۱۸).

فعالیت ضدمیکروبی (حداقل غلظت بازدارندگی MIC): اثر ضدمیکروبی پروتئین هیبریدی به دست آمده، از طریق تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مطالعه گردید. برای این منظور، رقت‌های متواالی از پلی پیتید (از غلظت ۱۵۶ الی ۱۳/۴ $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 پیتید آنتی‌میکروبیال بر سویه استاندارد و مقاوم Mueller Hinton کشت انتخاب گردید و در محیط 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

کشت آماده مطابق بالا) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید. همین عملیات بعد از ۲۴ ساعت در میکروپلیت های 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 پلی پپتیدهای ضد میکروبی در تماس قرار گرفتند. در روز سوم، محلول محیط حاوی پپتیدها از چاهک ها تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی formazon MTT با غلظت ۰.۵ mg/ml به چاهک ها اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و ۱۰۰ μ l CO₂ ۵% کربوکسیلیک اسید formazan با افزودن DMSO به صورت محلول درآمد و میزان جذب نوری چاهک ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری گردید و با تعیین نسبت جذب نوری هر نمونه به جذب نوری نمونه کنترل منفی (۱۰۰ viability درصد)، نسبت بقای سلولها محاسبه شد (۱۲) و غلظتی از پپتید که در آن ۵۰ درصد سلول ها زنده بودند، به عنوان غلظت IC50 گزارش شد. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به صورت تکرار سه تایی صورت گرفت. با استفاده از درون یابی مقادیر MIC برای همه تکرارها تعیین گردید و آنالیزهای آماری روی این مقادیر انجام شد. از منحنی Box- Plot برای تشخیص داده های پرت (Outlier) و از آزمون Shapiro-Wilk برای بررسی توزیع نرمال نتایج MIC استفاده گردید. برای ارزیابی یکسان بودن واریانس ها از آزمون Levene و از آزمون one way ANOVA و آزمون Games- Howell (در شرایط برابری واریانس ها) و آزمون post -hoc LSD و (در شرایط واریانس های نامساوی) برای مقایسه IC50 پلی پپتیدهای موردمطالعه استفاده شد (۱۳).

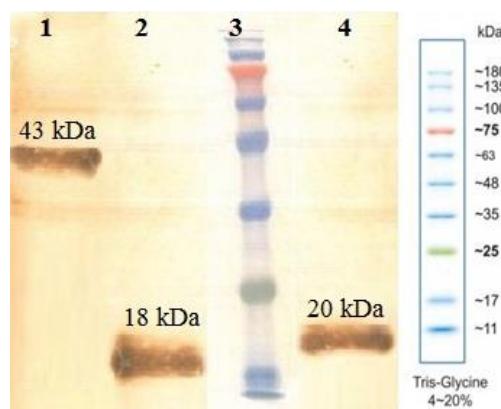
یافته ها

وسترن بلاست برای تأیید بیان پروتئین هدف: با توجه به اینکه در سکانس های پروتئین های مدنظر دنباله هیستیدینی تعییش شده بود، آزمون وسترن بلاست با استفاده از آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی صورت گرفت. تطابق باندهای مشاهده شده پس از مرحله القای باکتری با باندهای آزمون

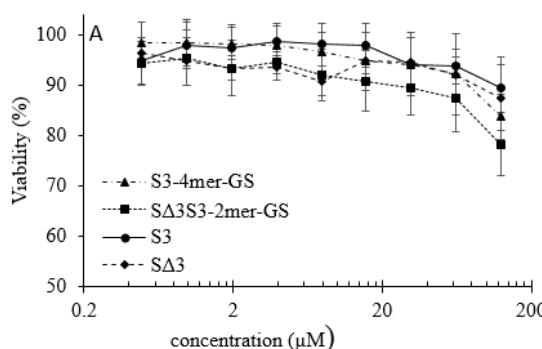
استفاده گردید. برای ارزیابی یکسان بودن واریانس ها از آزمون Levene و از آزمون one way ANOVA و آزمون LSD و -hoc (در شرایط برابری واریانس ها) و آزمون Games- Howell (در شرایط واریانس های نامساوی) برای مقایسه MIC پلی پپتیدهای موردمطالعه استفاده شد (۱۳, ۱۶).

اثر سمیت پپتید بر سلول های یوکاریوتی: مطابق استاندارد ISO10993-5 و به سه روش آزمون NRU، آزمون CFU و آزمون MTT و آزمون XTT انجام می گیرد. متداول ترین روش در ارزیابی سمیت سلولی، سنجش بقای سلولی به -dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(۳,۴- dimethyltetrazolium bromide (diphenyltetrazolium bromide) است. رده سلولی ۲۵ (ATCC: HTB-26) از بانک سلولی انسنتیو 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) در CO₂ ۵% در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت گردید. پس از ۴۸ ساعت و تشکیل یک لایه سلولی بر دیواره فلاسک، سلول ها دوباره پاساز داده شد و دوباره پس از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایه سلول ها، به وسیله تیمار ملایم با تریپسین از دیواره کنده شد و با سانتیفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه، با تخلیه سوپر ناتانت، تریپسین از سلول ها حذف گردید و سلول ها دوباره در محیط کشت بالا حل شد و پس از اطمینان از viability سلول ها از طریق رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول ها با استفاده از لام نوبار در زیر میکروسکوپ، سلول ها 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 سلول ها و اتصال آن ها به دیواره، محیط کشت داخل چاهک ها از طریق مکش تخلیه شد و غلظت های مختلف هریک از پلی پپتیدهای ضد میکروبی (رقت های متوالی با نسبت یک دوم رقیق شده در محیط

استفاده شد. در همه موارد $P < 0.05$ 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 حداقل غلظت استفاده شده آنها ($125 \mu\text{M}$) انتخاب شد و نتایج میزان سلول‌های زنده در تماس با این غلظت از لحاظ آماری ارزیابی گردید. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف نتایج این غلظت، از آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسه اثر زمان بر میزان بقای سلولی، برای هریک از پلی‌پپتیدها به صورت جداگانه بین داده‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون Independent T-test استفاده گردید. $P < 0.05$ بیانگر معنا دار بودن اختلاف میزان سمیت توالی هیریدی با توالی‌های تترامر، S3، و SΔ3 بود. میزان بقای سلولی پس از تماس با $125 \mu\text{M}$ میکرومول از هریک از توالی‌ها در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱. ایمونوبلاتینگ با استفاده از دنباله هیستیدینی؛ شماره ۱. نمونه پروتئینی کنترل مثبت حاوی دنباله هیستیدینی (۴۳ کیلو Dalton)؛ شماره ۲. پروتئین تترامر (تقرباً $18/3$ کیلو Dalton)؛ شماره ۳. مارکر پروتئینی؛ شماره ۴. هیریدی (تقرباً $20/7$ کیلو Dalton)

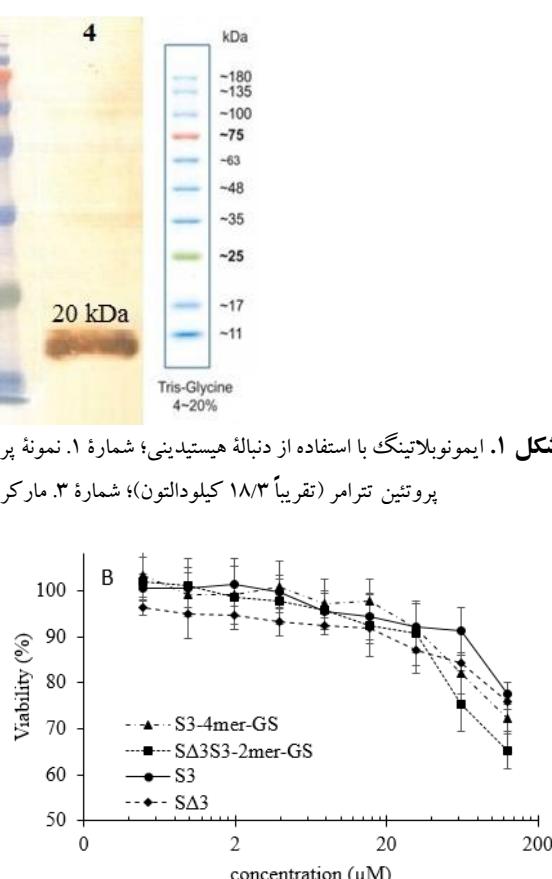


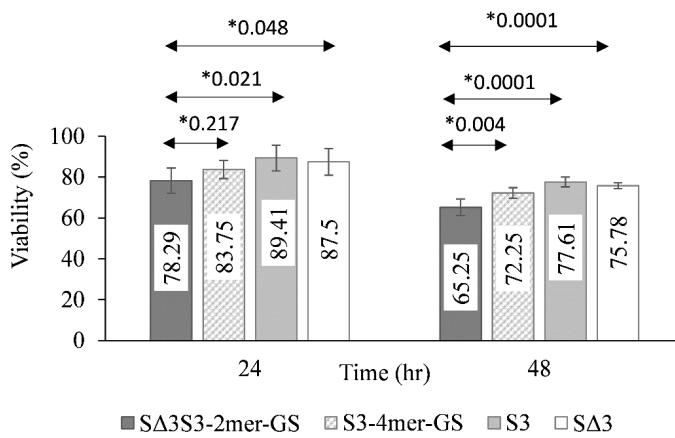
شکل ۲. نمودار تغییرات میزان بقای سلولی به ازای غلظت‌های مختلف هریک از پلی‌پپتیدها در زمان ۲۴ (A) و ۴۸ ساعت (B)

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 هریک از میکروپلیت‌ها، میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک از جذب نوری هریک از چاهک‌ها کسر گردید. در هر پلیت، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل نیز به عنوان Abs_{control} در نظر گرفته و در صد بقای سلولی از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

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

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 شاپرو برای ارزیابی نرمال بودن توزیع نتایج





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

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

AMP	Mw(Da)	$\text{MIC}_{\text{GM}}(\mu\text{g/ml})$	$\text{MIC}_{\text{GM}}(\mu\text{M})$	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

(ATCC27853) و سویه کلینیکی مقاوم ایزوله شده در کلینیک طوس و *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:

Growth Inhibition (%) = $(\text{OD maximum growth} - \text{OD sample}) / \text{OD maximum growth} * 100$
منحنی بازدارندگی بر حسب غلظت پلی‌پتید رسم گردید. نتایج مربوط به اثر بازدارندگی هریک از پلی‌پتیدها 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 درصدی رشد باکتری‌های مدنظر گردید، به عنوان ۹۰ 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

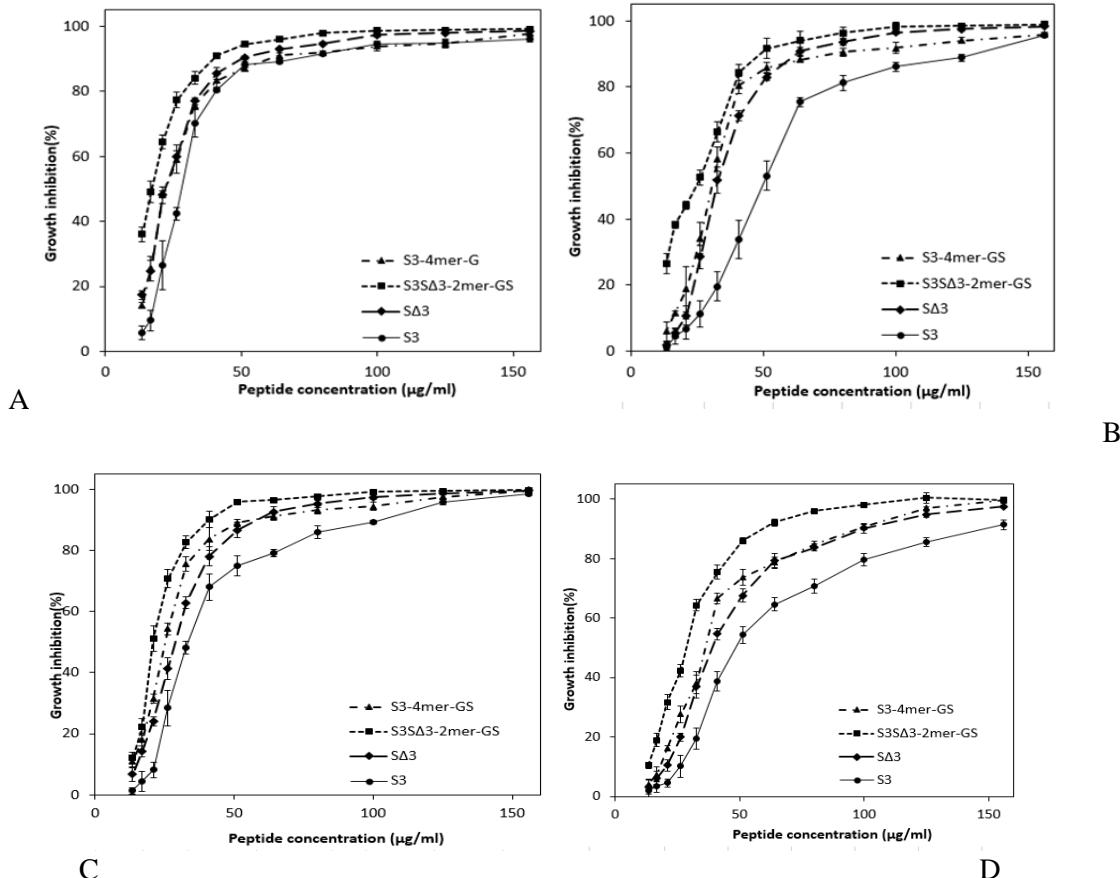
بر اساس شکل شماره ۳ ثابت می‌گردد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همه پتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند و سمیت این پتیدها در حالت استاندارد و موتنات بر سلول‌ها یوکاریوت اندک است. از آنجاکه غلظت ۱۲۵ میکرومول بسیار بیشتر از غلظت فعال ضدبیکروبی توالی‌ها بود؛ بنابراین، میزان سمیت توالی‌ها در غلظت میانگین بازدارندگی رشد میکروبی محاسبه گردید. برای این منظور، مقادیر MIC میانگین هندسی به دست آمده از مرحله آزمون ضدبیکروبی، با استفاده از وزن مولکولی هریک از توالی‌ها به میکرومول بر میلی لیتر 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 خالص بیکروبی: تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از توالی‌های هیبریدی، تترامر و پتیدهای سازنده آن‌ها، روی رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* (سویه

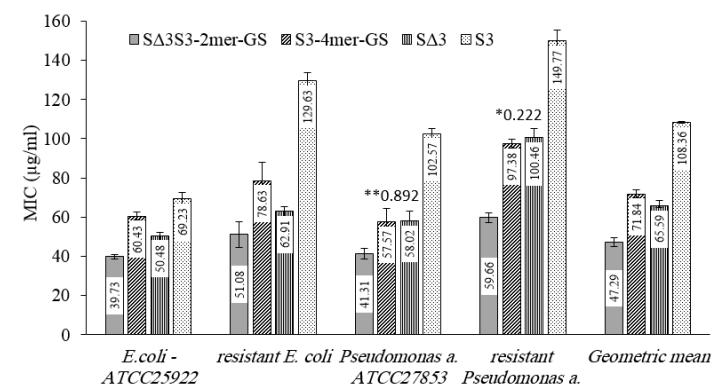
بیانگر اثر مثبت بیان هیبریدی روی فعالیت ضد میکروبی این توالی است.

شکل شماره ۵ بیان می کند که موتابت های مشتق از S3 در غلظت های پایین تری، خاصیت ضد میکروبی نسبت به آن دارند و در حالت $S\Delta 3S3-2mer-GS$ 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 $S\Delta 3$ ، 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 بازدارندگی رشد پلی پپتیدها بر رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa*



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

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجاکه باکتری‌های مقاوم به دارو به علت تجویز بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها ظهور کردند، به کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز است و پیتیدهای ضد میکروبی با آثار جانبی کمتر و تأثیر بالاتر و همچنین ایجاد نکردن مقاومت در باکتری می‌توانند جایگزین ارزشمند را ارائه دهنند. پیتیدهای ضد میکروبی عناصر اصلی سیستم ایمنی ذاتی هستند. این پیتیدهای پیتیدهای کوچکی هستند که به علت حضور لیزین و یا آرژنین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند که عامل فعالیت ضد میکروبی مستقیم این پیتیدها است (۲۱). غشاء میکرووارگانیسم‌هایی نظیر باکتری و قارچ، فسفولیپیدهایی با بار منفی در طرف خارجی غشا دارند که پیتیدهای ضد میکروبی در اثر تعامل با این غشاء دارای بار مخالف، در آن اختلال ایجاد می‌کند و درنتیجه، موجب از بین رفتن میکروب‌ها می‌گردد (۱). یکی از این روش‌های کاربردی برای استفاده از این پیتیدها به عنوان آنتی‌بیوتیک هیبرید و ترکیب کردن پیتیدهای ضد میکروبی با یکدیگر است که می‌تواند باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی، افزایش محدوده فعالیت ضد میکروبی روی ارگانیسم‌های مختلف یا افزایش قدرت تمایلی آن‌ها به اندوتوكسین شود، بدون اینکه خاصیت سمیت آن‌ها افزایش چشمگیری داشته باشد (۲۲). بیان نوترکیب پیتیدهای ضد میکروبی به صورت مولتی‌مر یا هیبرید، نوع خاصی از بیان فیوژن است که امکان دسترسی به مقادیر بیشتری از پیتیدهای ضد میکروبی را فراهم می‌کند (۱۶). دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بیان ژن پیتید S3 به صورت مونومر، دیمر، تترامر و اکتامر دریافتند که فرم تترامر آن بیشترین میزان S3 بیان را دارد (۲۳). درباره پیتید ضد میکروبی S3 گزارش شده است که از میان حالات دیمر، تترامر و اکتامر، بیشترین فعالیت مربوط به فرم تترامر این پیتید است (۲۴). نوآوری تحقیق حاضر در این است که برای افزایش خاصیت ضد میکروبی پلی‌پیتید S3، از روش هیبریداسیون استفاده شد، به طوری که دو واحد پیتید S3 سازنده فرم

تترامر، با پیتید ضد میکروبی SΔ3 جایگزین گردید. اتصال دهنده‌های پیتیدی گلایسین - سرین که در گروه اتصال دهنده‌های پیتیدی 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 اتصال دهنده و مقایسه کارایی آن‌ها در آینده باشد (۲۵). باغ بهشتی و همکاران از این اتصال دهنده‌های پیتیدی در بیان نوترکیب پیتید S3 استفاده کردند و مشاهده نمودند که این لینکر در مقایسه با اتصال دهنده‌های پیتیدی سخت آسپارتیک اسید - پرولین، باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی پروتئین به دست آمده گردید (۱۶). در این تحقیق، اثر بیان هیبرید پیتیدهای SΔ3 و S3 با لینکر گلایسین سرین مطالعه شد و برای مطالعه اثر هیبریداسیون، خاصیت ضد میکروبی و سمیت آن با حالت تترامر S3 مقایسه گردید؛ بنابراین، دو پلی‌پیتید هیبرید و تترامر از نظر توالی لینکر بین تکرارها و تعداد اسید آمینه‌ها کاملاً یکسان بودند و تفاوت‌های مشاهده شده در فعالیت بیولوژیکی آن‌ها، صرفاً مربوط به جایگزینی دو پیتید S3 با پیتید 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 سترن (علیه دنباله هیستیدینی) انجام و بیان آن‌ها تأیید شد. پس از مرحله بیان در برخی از کلون‌های بیان کننده پلی‌پیتید هیبرید و تترامر، باندهای سنگین‌تر از پروتئین هدف مشاهده گردید که با انجام آزمون و سترن، حضور دنباله هیستیدینی در این باندها تأیید شد. شکست باندهای دیمر در حالت احیای آزمون SDS-PAGE و پرنگ‌تر شدن باند مربوط به پلی‌پیتید منومر، بیان‌گر حضور باندهای دی‌سولفیدی در این پروتئین‌ها است که به نظر می‌رسد به سبب منعطف و طویل بودن لینکر گلایسین سرین از نظر فضایی، امکان نزدیک شدن سیستئین از یک منومر با منومر دیگر و درنتیجه، تشکیل پیوند دی‌سولفیدی میان

۱۴) نیز مشاهده شد. در بیان نوترکیب پیتیدهای 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 هیرید از پیتیدهای سازنده آنها (S3 و S Δ 3) کمتر است و درنتیجه، سمیت توالی هیریدی در غلظت ۱۲۵ میکرومول از پیتیدهای تشکیل دهنده آن حداقل حدود ۱۱ درصد بیشتر است؛ اما اختلاف حدود ۵ درصد در مقادیر بقای سلولی توالی هیریدی و تترامر معنا دار نبود و به عبارت دیگر، سمیت این توالی‌های هیریدی و تترامر تقریباً یکسان است؛ اما پس از ۴۸ ساعت تماس، اختلاف مشاهده شده میان مقادیر بقای سلولی در مورد توالی هیرید با توالی‌های تترامر و پیتیدهای سازنده معنا دار بود و این بدین معنی است که میزان سمیت توالی هیریدی تقریباً به ترتیب ۱۲، ۱۰ و ۱۲ درصد بیشتر از سمیت توالی تترامر، S3 و S Δ 3 بود. تنها تفاوت سمیت حالت تترامر با منومرهای سازنده آن (S Δ 3، S) معنی دار بود. همان طور که نشان داده شد، میزان بقای سلولی برای هریک توالی‌ها با افزایش زمان، کاهش پیدا می‌کرد؛ بنابراین، سمیت توالی‌ها به زمان نیز وابسته بود و با افزایش زمان تماس، افزایش می‌یافتد. تأثیر بیان هیرید دو پیتید ضد میکروبی S3 و S Δ 3 در سویه E.coli BL 21 (DE3) بیان گردید و با میزان بیان و فعالیت بیولوژیک پروتئین نوترکیب تترامر S3 مقایسه شد. مقایسه میزان بیان پروتئین حالت پیتید با حالت تترامر بیانگر این بود که افزایش بار مثبت در پروتئین هیرید، برای باکتری میزان اثر سمیت ایجاد نمی‌کند. مقایسه فعالیت ضد میکروبی این دو پروتئین بیانگر اثر مثبت بیان هیرید در افزایش خاصیت ضد میکروبی پروتئین حاصله بود و هر چند میزان سمیت پروتئین هیرید 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 مونومر فراهم شده است و پروتئین به حالت دیمر تبدیل می‌گردد. نتایج مطالعات لی و همکاران در سال ۲۰۰۴، این فرضیه را تأیید می‌کند. آنان در مطالعه خود، تشکیل باند دی سولفیدی میان مونومرهای پیتید S3 و درنتیجه، تشکیل فرم دیمر این پیتید را تأیید کردند. آنان از طریق جایگزینی سیستین شماره ۲۷ با سرین در توالی پیتید S3 و مقایسه قدرت اتصال موتابت حاصله به LPS دریافتند که قدرت اتصال پیتید S3 در حالت وجود باندهای دی سولفیدی، به مراتب بیشتر از حالت موتابت بدون این پیوند است (۲۶). برای بررسی اثر بیان هیرید پیتیدهای S3 و S Δ 3، میانگین غلظت بازدارندگی رشد میکروبی پروتئین حالت پیتید با مقدار متناظر آن از پروتئین تترامر S3 مقایسه گردید. همان طور که نشان داده شد، مقدار MIC_{GM} توالی هیریدی از مقدار متناظر مربوط، نسبت به حالت بیان تترامر و پیتیدهای سازنده آن شامل S3 و S Δ 3 به ترتیب باعث بهبود ۳۴ و ۲۸ درصدی بهبود یافته بود. واریانتی از پیتید S Δ 3 است که از طریق جایگزینی دو اسید آمینه گلوتامیک اسید و گلایسین بالیزین، بار مثبت خالص آن ۳ بار افزایش یافته و این امر باعث بهبود خاصیت اتصال آن به لیپولیپی ساکارید دیواره باکتری‌های گرم منفی گردیده است (۲۷). در تحقیق حاضر، بیان هیرید توالی S3 و S Δ 3 باعث افزایش بار مثبت خالص پروتئین حاصله (+۶) در مقایسه با حالت تترامر S3 شد. افزایش بار مثبت پیتیدهای ضد میکروبی عموماً باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی می‌گردد؛ به عنوان مثال، گزارش شده است که تعویض اسید آمینه گلایسین در توالی پیتید ضد میکروبی alyteserin-2a باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی آن گردید (۲۸). به طور مشابه، در واریانت جدیدی از پیتید S3، حذف بار منفی از توالی این پیتید، به افزایش بار مثبت و درنتیجه، بهبود خاصیت ضد میکروبی آن منجر شد (۱۳). در تحقیق دیگری، افروزن اسید آمینه لیزین به پیتید ضد میکروبی magainin باعث افزایش بار مثبت و خاصیت ضد میکروبی واریانت جدید گردید (۲۹). همین اثر در سایر پیتیدهای ضد میکروبی نظیر pseudin-2 (۳۰)، temporine (۱۵) و

بيان هیبرید پلیپپتید ضد میکروبی S3 و SΔ3 راهکار مناسبی برای دستیابی به مقادیر مناسب از پروتئین ضد میکروبی با خاصیت ضد میکروبی ارتقا یافته است.

تعارض منافع

نویسنده‌گان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این

مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق

این مطالعه فاقد کارآزمایی بالینی بوده و کد اخلاق نیاز نداشت.

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 Sushi1 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 *α*helical 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.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 pHLP 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 ,Abualhaijaa 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 s83 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, Arafa 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