JIMUS

Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Sadegh Rezaei[1], Sahin Hadadian[2*], Ramazan Ali Khavarinejad[1], Dariush Norouzian[2]

[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

A B S T R A C T

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.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIMUS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مقایسهٔ خاصیت ضدمیکروبی و سمیت پپتید S3 طبیعی با منشأ خرچنگ نعل‌اسبی، با موتانت 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، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

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 فناوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
Email:
hadadian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پپتیدهای ضدمیکروبی (AMP) ترکیباتی با خاصیت ضدمیکروبی هستند که به سبب ظهور مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه و بررسی می‌شوند. در مطالعهٔ حاضر، آثار سمیت و ضدمیکروبی دو پپتید مونومری S3 طبیعی به‌عنوان استاندارد و SΔ3 با هیبرید S3- SΔ3 و تترامر S3 بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش ها: هیبرید پروتئینی (SΔ3S3-2mer-GS) S3- SΔ3 و پروتئین تترامر S3 (S3-4mer-GS) در باکتری *E.coli*. BL21 (DE3) بیان شدند؛ سپس وجود پپتیدهای موتانت تأیید و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها با مونومرهای S3 و SΔ3 مطالعه گردید. درنهایت، سمیت تترامر و هیبرید ساخته‌شده روی ردهٔ سلولی MDA-MB-231 ارزیابی و مقایسه شد.

یافته‌ها: در بیان پروتئین نوترکیب، افزایش بار مثبت در پروتئین هیبرید برای باکتری میزبان اثر سمیت ایجاد نمی‌کند. میزان سمیت هیبرید در مقایسه با تترامر برای سلول‌های یوکاریوتی 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 توالی ها، با افزایش زمان کاهش پیدا می‌کرد. علاوه بر این، بازدارندگی رشد میکروبی هیبرید نسبت به تترامر، SΔ3 و S3 بهبود یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به میزان بیان مناسب و افزایش فعالیت ضدمیکروبی و سمیت سلولی اندک، پپتید هیبرید S3 هیبرید S3 و SΔ3 و تترامر S3 می‌توانند به‌عنوان یک استراتژی تولید مؤثر برای به دست آوردن AMPها در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: پپتید تترامر S3، هیبرید پروتئینی S3- SΔ3، خرچنگ نعل‌اسبی، فاکتور C، پپتیدهای ضدمیکروبی

استناد: رضایی، صادق؛ حدادیان، شاهین؛ خاوری نژاد، رمضانعلی؛ نوروزیان، داریوش. مقایسهٔ خاصیت ضدمیکروبی و سمیت پپتید S3 طبیعی با منشأ خرچنگ نعل‌اسبی، با موتانت های حاصل از آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۰؛۲۹(۴): ۷۳-۶۰.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

حق‌مؤلف © 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 آنتی میکروبیال سنتتیک و طبیعی را دوچندان کرده است ؛ ازاین‌رو، بررسی آثار پپتیدهای سنتتیک ضدباکتریایی می‌تواند راه را برای به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید هموار سازد. پپتیدهای ضدمیکروبی 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 پپتیدها به علت ظرفیت مداخله‌گر آن‌ها در غشای میکروبی است که با ایجاد منافذ در غشا، به مرگ سلولی می‌انجامد. پپتیدهای ضدمیکروبی پپتیدهای کوچکی هستند که به سبب حضور لیزین و یا آرژنین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند. خاصیت اصلی ساختاری پپتیدهای ضدمیکروبی که ناشی از بار مثبت و خاصیت آمفی‌پاتیک آن‌هاست، عامل فعالیت ضدمیکروبی مستقیم این پپتیدها است (۱). پپتیدهای 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 توسعهٔ مقاومت علیه آن‌ها می‌شود (۲)؛ درنتیجه، این پپتیدها به‌واسطهٔ قابلیت کاربرد آن‌ها، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید، منفعت بسیار دارند. سازوکار فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی، توانایی آن‌ها در تخریب غشای سلولی است. پپتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند با میکروارگانیسم‌ها به‌وسیلهٔ نیروهای الکترواستاتیک، میان اسیدهای آمینهٔ مثبت خود با اسیدهای آمینهٔ منفی روی سطح میکروارگانیسم‌ها برهم‌کنش کنند. ازآنجاکه بار منفی سطحی غشای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی بیشتر است، به نظر می‌رسد که پپتیدهای ضدمیکروبی سازوکار مشابهی در تخریب غشای این نوع سلول‌ها داشته باشند (۳). به‌سبب آنکه پپتیدهای ضدمیکروبی از مولکول‌های مهم ایمنی ذاتی بدن هستند و سمیت سلولی اندکی دارند، می‌توانند در آینده‌ای نه‌چندان دور، به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های التهابی و همچنین شوک‌های سپتیک حاصل از اندوتوکسین باکتری‌ها استفاده شوند. پپتیدهای ضدمیکروبی با سازوکارهای متفاوتی، بر سلول‌های مهاجم اثر می‌گذارند و باعث تخریب آن‌ها می‌گردند. این پپتیدها 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 پپتید به سلول، آثار پپتید افزایش می‌یابد؛ بنابراین، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های گوناگون پپتید برای بررسی تغییرات اتصالی و آثار کشندگی پپتید ضروری است که از طریق تخریب غشایی و یا تخریب‌های درون‌سلولی اعمال می‌شوند (۴). به‌طورکلی سنتز پپتیدها، فرایند پیچیده، پرهزینه و زمان‌بری است و جداسازی پپتیدهای 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 پپتیدها اغلب آمینواسیدهای تغییرشکل یافته و اصلاح‌شده‌ای دارند که با پروتئین‌های ساخته‌شده توسط ریبوزوم‌ها متفاوت‌اند. در حال حاضر، روش‌های تولید نوترکیب به سبب بیان پروتئینی اندک و حساسیت به پروتئازهای موجود در محیط، مناسب نیست و امروزه، بیان پروتئین‌های هیبریدی و مولتی مر در عمل، روش‌هایی اقتصادی به نظر می‌آیند؛ اما دربارهٔ پپتیدهای خطی S1 یا S3 مشتق از پپتید Sushi خرچنگ نعل‌اسبی که یک سد دفاعی طبیعی در این جاندار در برابر تهاجم باکتری‌های گرم منفی است، در همهٔ مقالات موجود از روش سنتز فاز جامد این پپتیدها استفاده شده و تنها گزارش تولید نوترکیب آن‌ها، مربوط به بیان مولتی‌مر S3 در میزبان *E.coli* BL21 (DE3) است (۶). رائو و همکاران نیز در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

سال ۲۰۰۵، پپتید ضدمیکروبی hPAB-β را به‌صورت مولتی‌مر در(DE3)*E.coli* BL21بیان 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 به‌صورت ترایمر بود (۷). پپتید SΔ3 واریانت ارتقایافتهٔ پپتید S3 است که در آن با تغییر دو اسید آمینهٔ G9 و E11 به لیزین، بار مثبت پپتید، خاصیت ضدمیکروبی و البته اثر سمیت آن افزایش یافته است (۸). از سویی، تحقیقات نشان داده است که فرم‌های مولتی‌مر پپتیدS3 نیز خاصیت ضدمیکروبی دارند. لینکرهای گلایسین سرین به علت قابل‌انعطاف 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 می‌گردند (۹). پپتیدهای غنی از گلایسین جداسازی شده از دستگاه‌های دفاعی موجوداتی نظیر عقرب و خرچنگ عقربی، خاصیت ضدمیکروبی 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 می‌شود) و یک حالت تترامر پپتید S3 با لینکر گلایسین سرین (S3-4mer-GS) (که پس از این، پروتئین تترامر نامیده می‌شود)، به‌عنوان واریانت کنترل برای بررسی اثر بیان هیبریدی بودند. بر اساس تعاریف بالا، هدف اصلی این پژوهش تلاش برای طراحی و تولید موتانت‌های مؤثرتری از این پپتید به‌عنوان پپتیدهای ضدمیکروبی است.

مواد و روش ها

سنتز ژن: برای تعیین توالی DNA، توالی‌های پروتئینی طراحی‌شده از ترجمهٔ معکوس سایت ExPASy استفاده شد. سایت‌های برشی NdeI و XhoI به انتهای '3 ,'5 آن و دنبالهٔ هیستیدنی و همچنین سایت برش انتروکیناز به آن اضافه گردید و سنتز ژن به شرکت Biomatik کانادا سفارش داده شد. سازه های ژنی در وکتور (+)pET-26b دریافت گردید. برای سهولت، توالی mer-GS۳-۲S۳SΔ و mer-GS۳-۴S به ترتیب با نام‌های توالی هیبریدی و تترامر نامیده می‌شوند.

تکثیر پلاسمید، تخلیص و تهیهٔ سلول‌های مستعد: باکتری *E. coli TOP10F/* برای تکثیر پلاسمیدهای مدنظر استفاده شد. به این منظور، پس از تازه کردن محیط کشت این باکتری، وکتورهای طراحی‌شدهٔ حاوی ژن های مدنظر به آن منتقل گردید و روی محیط‌های کشت حاوی آنتی‌بیوتیک های کانامایسین و تتراسایکلین که موجب رشد اختصاصی سویه‌های 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 Qiagen extraction kit (Germany) صورت گرفت و نمونه ها برای مشاهدهٔ کیفیت عمل استخراج، روی ژل آگارز ۱ درصد (Agarose RPI) برده شدند. برای انتقال سازهٔ ژنی به سلول‌های *E. Coli* لازم است که با استفاده از تیمارهای خارجی، سلول باکتری را آماده کرد. از استوک میزبان باکتریایی *E. Coli* سویهٔ *BL21(DE3)* موجود در فریزر منفی ۷۰ درجه، ۱۰ میکرولیتر برداشته و با لوپ شیشه‌ای روی پلیت حاوی LB(LB agar Thermo Fisher) آگار کشت داده و پلیت به مدت یک‌شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد گرماگذاری شد. از هریک از کلنی‌های رشدیافته بر پلیت‌های بالا، یک کلنی برداشته و در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB(LB broth Thermo Fisher) مایع تلقیح گردید و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۳ تا ۴ ساعت با سرعت ۱۷۰ rpm کشت داده شد. هنگامی‌که جذب نوری سلول‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ (فاز لگاریتمی) رسید، سلول ها به کمک سانتریفوژ در دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه رسوب داده و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در ۹۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از $CaCl_2$ (Sigma – Aldrich) سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سلولها در دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۶۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از CaCl2 سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سلول‌ها دوباره در دور ۹۰۰۰rpm 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، سازهٔ ژنی به‌منظور بیان به باکتری E. coli سویهٔ (DE3)BL21 منتقل می‌شود. پس از انتقال سازه های ژنی به سلول های 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 طول‌موج 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 درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۶). مراحل بیان این پروتئین ها در باکتری با استفاده از آزمون SDS-PAGE و Western blotتأیید گردید.

استخراج پروتئین نوترکیب: پس از جداسازی بیومس از محیط کشت به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ، دیوارهٔ سلولی از طریق حل کردن پلت ها به نسبت ۱:۵ وزنی/ حجمی در محلول لیزکنندهٔ (Tris Sigma-Aldrich, HCL 33% (Tris- 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 دیوارهٔ سلولی شکسته شده، اینکلوژن بادی ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور rpm ۹۰۰۰ به‌صورت 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 سانتریفیوژ بر اساس شرایط بالا، سوپرناتانت دور ریخته و پلت ها جمع آوری گردید؛ سپس اینکلوژن 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. درنهایت، با استفاده از سانتریفیوژ، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۹۰۰۰، مایع رویی حاوی پروتئین حل‌شده جمع‌آوری گردید (۱۶).

تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی یون فلزی (IMAC): برای تخلیص هریک از توالی ها، یک میلی‌لیتر رزین NiNTA (Agarose Bead Technologies-ABT) (۲ ml سوسپانسیون ۵۰ درصد) درون ستون (HiTrap® (SP Fast Flow Cytiva Hitrap یک میلی لیتری ریخته شد و پس از متعادل‌سازی با ۵ میلی لیتر بافر متعادل‌سازی با شدت جریان ml/min۱، 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 مشاهدهٔ پیک، فرکشن های یک میلی‌لیتری مربوط به مشاهدهٔ پیک جمع‌آوری شدند (۷۶). درنهایت، ستون با استفاده از ۵ حجم محلول بازیابی برای استفادهٔ مجدد شستشو داده و با عبور دادن اتانول ۲۰ درصد (دو حجم ستون) تا استفاده بعدی در یخچال نگهداری گردید. حضور پپتید هدف در نمونهٔ شویش (جداسازی شده از ستون) با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد (۱۶). غلظت پروتئین‌های تخلیص شده با استفاده از اندازه‌گیری جذب نوری در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر و تقسیم جذب نوری بر ضریب خاموشی ۰/۱ درصد آن‌ها محاسبه گردید. ضریب خاموشی پروتئین‌های ترامر 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 $M^{-1}cm^{-1}$ تخمین زده شد (۱۷).

وسترن بلاتینگ (Western Blotting): پروتئین‌هایی که در مرحلهٔ 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 ۷۰ $\mu g/cm^2$) برای اتصال پروتئین‌ها

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

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 نیتروسلولز، کاغذ به مدت O/N در بافر Phosphate buffered saline (PBS Gibco) حاوی Bovine Serum Albumin (BSA Siga-Aldrich) 5% قرار داده شد. روز بعد، پس از ۳ بار شستشوی کاغذ با بافر PBS حاوی ۰/۰۵ ٪ Tween20 (Tween RPI)، آنتی‌بادی علیه دنبالهٔ 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 اکسیداز Diaminobenzidine (DAB Thermo Fisher) tetrahydrochloride (DAB) حاوی ۲۰ میکرولیتر H_2O_2 به آن اضافه گردید. در اثر واکنش DAB و پراکسیداز روی کاغذ نیتروسلولز و مشاهدهٔ 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 به‌دست‌آمده، از طریق تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مطالعه گردید. برای این منظور، رقت‌های متوالی از پلی پپتید (از غلظت ۱۵۶ الی ۱۳/۴ µg/ml) تهیه و به چاهک‌های پلیت ۹۶تایی استریل افزوده می‌شود. باکتری‌های گرم منفی مختلف *pseudomonas aeruginosa* سویهٔ استاندارد ATTC27853 و سویهٔ کلینیکی مقاوم ایزوله‌شده در کلینیک طوس و *Escherichia coli* سویهٔ استاندارد ATCC25922 و سویهٔ کلینیکی مقاوم برای مطالعهٔ اثر پپتید آنتی‌میکروبیال بر سویهٔ 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 از سرم نمکی سترون تا رسیدن به غلظت سلولی CFU/ml $۱۰^۵ \times ۵$ رقیق شد (حصول کدورت مشابه کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵). در شرایط سترون، میزان ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون در هریک از چاهک‌های ستون‌های ۲ الی ۱۰ ریخته شد. در چاهک‌های ستون شمارهٔ ۱۲ برای تست سترونی شرایط آزمون، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در چاهک‌های ۱، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از پروتئین‌های توالی های هیبریدی و تترامر با غلظت ۳۱۲۰ µg/ml (۲۰ برابر)، با استفاده از محیط کشت مولر هینتون ۱۰ برابر رقیق گردید و به غلظت ۳۱۲ µg/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 ادامهٔ این کار تا چاهک‌های شمارهٔ 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 تهیه‌شده 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 درجهٔ سانتی‌گراد، جذب چاهک‌ها در طول‌موج 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 همهٔ 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 آزمون LSD و post -hoc (در شرایط برابری واریانس‌ها) و آزمون Games-Howell (در شرایط واریانس‌های نامساوی) برای مقایسهٔ MIC پلی‌پپتیدهای موردمطالعه 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 -2,5-(yl-2-dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide) است. ردهٔ 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 10% Fetal FBS) (bovine serum حاوی آنتی بیوتیک (100 u/ml پنی‌سیلین و 100 µg/ml استرپتومایسین) در 5% CO_2 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد کشت گردید. پس از ۴۸ ساعت و تشکیل یک لایهٔ سلولی بر دیوارهٔ فلاسک، سلول ها دوباره پاساژ داده شد و دوباره پس از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایهٔ سلول ها، به‌وسیلهٔ تیمار ملایم با تریپسین از دیواره کنده شد و با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه، با تخلیهٔ سوپرناتانت، 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 رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ، سلول ها به میزان ۳۰۰۰ در ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک میکروپلیت (۹۶ چاهکه 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 چاهک‌ها از طریق مکش تخلیه شد و غلظتهای مختلف هریک از پلی پپتیدهای ضدمیکروبی (رقت‌های 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 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 پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی در تماس قرار گرفتند. در روز سوم، محلول محیط حاوی پپتیدها از چاهک ها تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی formazonMTT با غلظت 0.5 mg/ml به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و 5% CO_2، کریستال‌های formazan با افزودن ۱۰۰ µl DMSO به‌صورت محلول درآمد و میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری گردید و با تعیین نسبت جذب نوری هر نمونه به جذب نوری نمونهٔ کنترل منفی (viability۱۰۰ درصد)، نسبت بقای سلول‌ها محاسبه شد (۱۲) و غلظتی از پپتید که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها زنده بودند، به‌عنوان غلظت IC50 گزارش شد. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به‌صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. با استفاده از درون‌یابی مقادیر MIC برای همهٔ 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 آزمون LSD و post -hoc (در شرایط برابری واریانس‌ها) و آزمون Games-Howell (در شرایط واریانس‌های نامساوی) برای مقایسهٔ IC50 پلی‌پپتیدهای موردمطالعه استفاده شد (۱۳).

یافته ها

وسترن بلات برای تأیید بیان پروتئین هدف: با توجه به اینکه در سکانس های پروتئین های مدنظر دنبالهٔ هیستیدینی تعبیه‌شده بود، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه دنبالهٔ هیستیدینی صورت گرفت. تطابق باندهای مشاهده‌شده پس از مرحلهٔ القای باکتری با باندهای آزمون

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

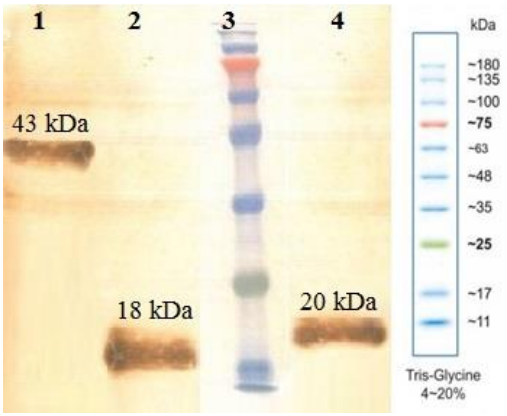
وسترن، بیان پروتئین هدف را تأیید می‌کند (شکل شمارهٔ ۱).

نتایج آزمون MTT: آزمون MTT با ردهٔ 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 به‌عنوان $Abs_{control}$ در نظر گرفته و درصد بقای سلولی از طریق رابطهٔ زیر محاسبه شد:

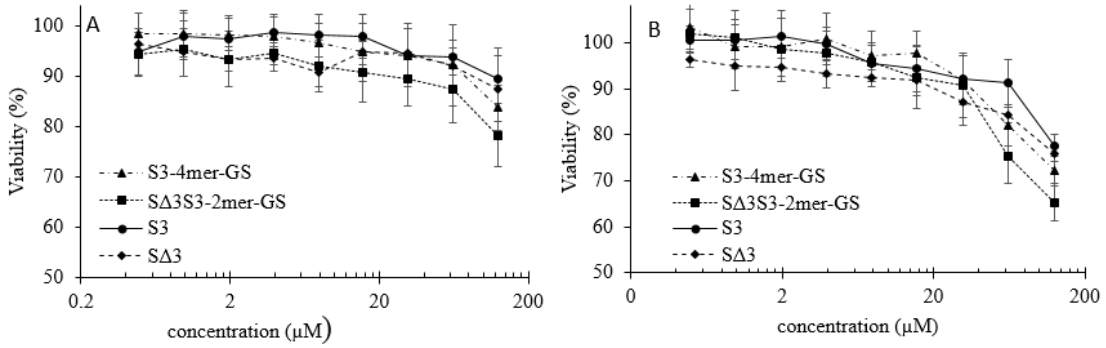
$$\%\ Cell\ Survival = (Abs_{sample} - Abs_{blank}) / (Abs_{control} - Abs_{blank}) * 100$$

شکل شمارهٔ ۲ نشان می‌دهد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همهٔ پپتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند که نشان‌دهندهٔ خاصیت سمیت اندک این پپتیدها در حالت استاندارد و موتانت بر سلول‌ها است.

از آزمون شاپیرو برای ارزیابی نرمال بودن توزیع نتایج استفاده شد. در همهٔ موارد P value>0.05 و درنتیجه، توزیع نتایج نرمال بود. با توجه به اینکه در هیچ‌یک از غلظت‌های آزمون MTT پلی‌پپتیدها، میزان سلول‌های زنده به کمتر از ۵۰ درصد افت نکرد (IC50)، برای بررسی و مقایسهٔ میزان سمیت پلی‌پپتیدها، غلظت حداکثر غلظت استفاده‌شدهٔ 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 مقایسهٔ اثر زمان‌بر میزان بقای سلولی، برای هریک از پلی‌پپتیدها به‌صورت جداگانه بین داده‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون Independent T- test استفاده گردید. P value<0.05 بیانگر معنا دار بودن اختلاف میزان سمیت توالی هیبریدی با توالی‌های ترامر،S3 و SΔ3 بود. میزان بقای سلولی پس از تماس با ۱۲۵ میکرومول از هریک از توالی‌ها در شکل شمارهٔ ۳ نشان داده‌شده است.

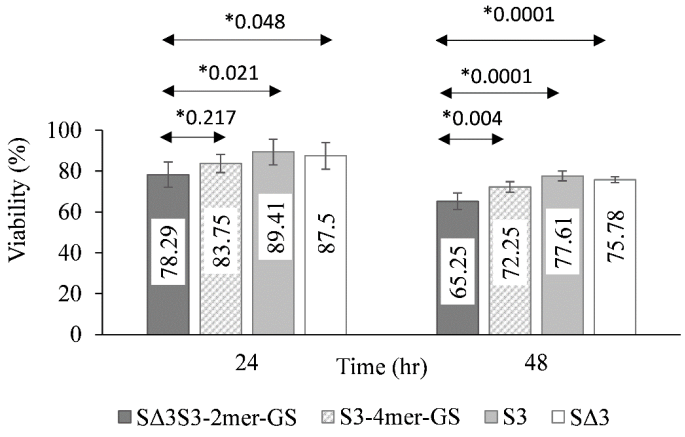


شکل ۱. ایمونوبلاتینگ با استفاده از دنبالهٔ هیستیدینی؛ شمارهٔ ۱. نمونهٔ پروتئینی کنترل مثبت حاوی دنبالهٔ هیستیدینی (۴۳ کیلودالتون)؛ شمارهٔ ۲. پروتئین ترامر (تقریباً ۱۸/۳ کیلودالتون)؛ شمارهٔ ۳. مارکر پروتئینی؛ شمارهٔ ۴. هیبریدی (تقریباً ۲۰/۷ کیلودالتون)



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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]



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

جدول ۱. میزان بقای سلولی در غلظت‌های فعال ضدمیکروبی هریک از توالی ها

AMP	M_W(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 شمارهٔ ۳ ثابت می‌گردد که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، همهٔ پپتیدها viability بالای ۵۰ درصد سلول‌ها را به همراه داشته‌اند و سمیت این پپتیدها در حالت استاندارد و موتانت بر سلول‌ها یوکاریوت اندک است.

ازآنجاکه غلظت ۱۲۵ میکرومول بسیار بیشتر از غلظت فعال ضدمیکروبی توالی‌ها بود؛ بنابراین، میزان سمیت توالی‌ها در غلظت میانگین بازدارندهٔ رشد میکروبی محاسبه گردید. برای این منظور، مقادیر MIC میانگین هندسی به‌دست‌آمده از مرحلهٔ آزمون ضدمیکروبی، با استفاده از وزن مولکولی هریک از توالی‌ها به میکرومول بر میلی‌لیتر تبدیل شد؛ سپس با استفاده از درون‌یابی روی منحنی های بقای سلولی، میزان بقای سلولی در این غلظت‌ها محاسبه گردید (جدول شمارهٔ ۱).

نتایج آزمون فعالیت ضدمیکروبی: تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از توالی‌های هیبریدی، تترامر و پپتیدهای سازندهٔ آن‌ها، روی رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* (سویهٔ استاندارد ATCC27853) و سویهٔ کلینیکی مقاوم ایزوله‌شده در کلینیک طوس و *E. coli* (سویهٔ استاندارد ATCC25922) و سویهٔ کلینیکی مقاوم، به‌صورت تکرارهای چهارتایی بررسی شد. در هر میکروپلیت، میانگین چاهک‌های بلانک از میانگین چاهک‌های حداکثر رشد کسر گردید و میزان بازدارندگی بر اساس رابطهٔ زیر محاسبه شد:

Growth Inhibition (%) = (OD maximum growth - OD sample)/ OD maximum growth *100

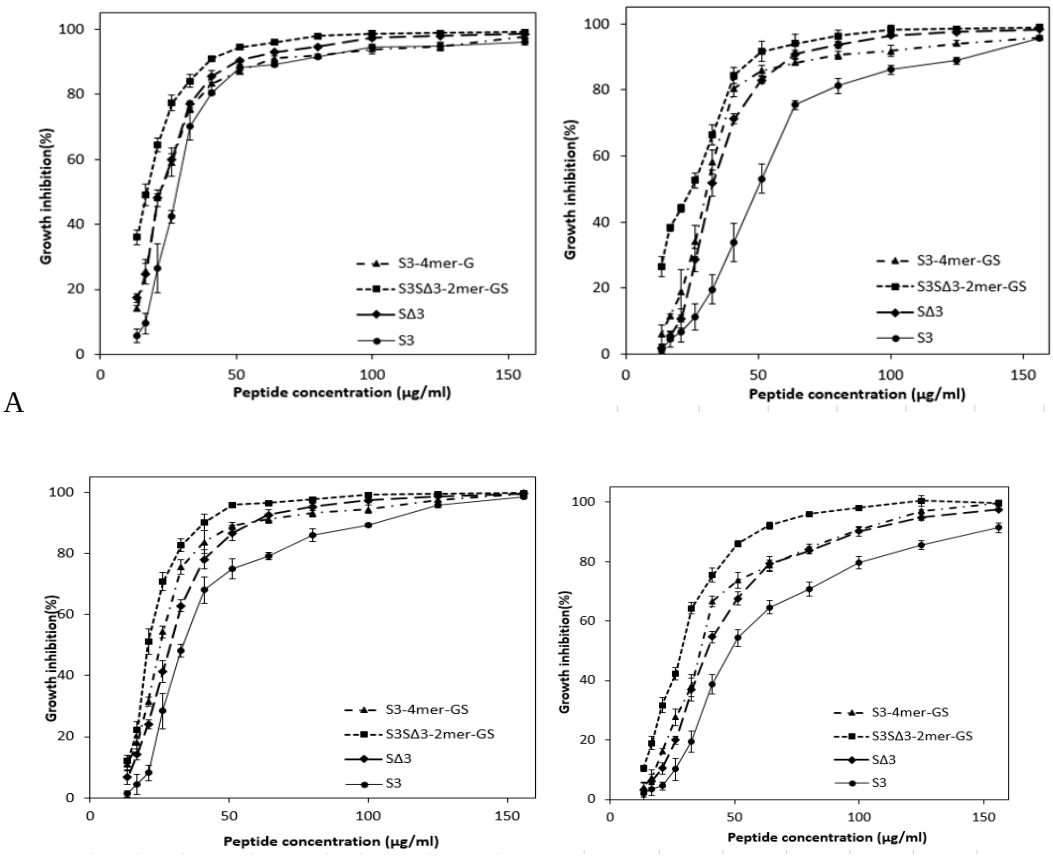
منحنی بازدارندگی برحسب غلظت پلی‌پپتید رسم گردید. نتایج مربوط به اثر بازدارندگی هریک از پلی‌پپتیدها روی سویه‌های یادشده در شکل شمارهٔ ۴ آمده است. نتایج، میانگین تکرار ۴ آزمایش هستند و انحراف استاندارد نتایج به‌صورت error bar نمایش داده‌شده است. با استفاده از درون‌یابی، غلظتی از توالی‌ها که باعث کاهش ۹۰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

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

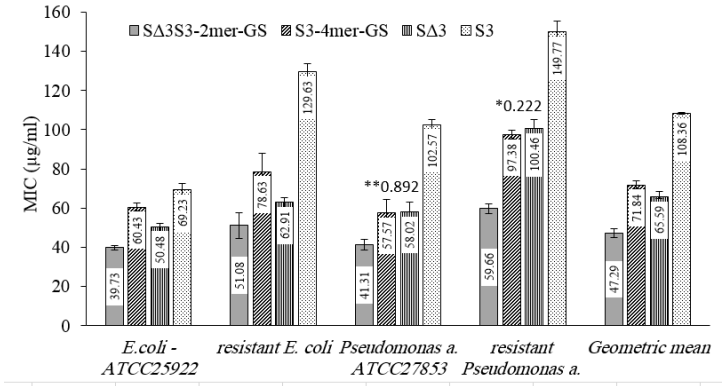
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

محاسبه گردید و به‌عنوان MIC برحسب µg/ml در شکل شمارهٔ ۵ گزارش شد. برای مقایسهٔ کلی اثر بیان هیبریدی از میانگین هندسی (Geometric mean) استفاده گردید. بر اساس غلظت میانگین هندسی، MIC توالی هیبریدی به‌ترتیب از MIC توالی‌های SΔ3، تترامر و S3 به‌ترتیب ۲۸ درصد، ۳۴ درصد و ۵۷ درصد کمتر بود که این امر بیانگر اثر مثبت بیان هیبریدی روی فعالیت ضدمیکروبی این توالی است.

شکل شمارهٔ ۵ بیان می‌کند که موتانت‌های مشتق از S3 در غلظت‌های پایین‌تری، خاصیت ضدمیکروبی نسبت به آن دارند و در حالت SΔ3S3-2mer-GS در پایین‌ترین اندازه است.



شکل ٤. A . منحنی بازدارندگی رشد پلی‌پپتیدها روی رشد باکتری *E.coli* ATCC 25922؛ B. منحنی بازدارندگی رشد پلی‌پپتیدها بر رشد باکتری *E.coli* کلینیکال مقاوم؛ C. منحنی بازدارندگی رشد پلی‌پپتیدها روی رشد باکتری *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC27853؛ D. منحنی بازدارندگی رشد پلی‌پپتیدها بر رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* کلینیکال مقاوم



شکل ۵. حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

بحث و نتیجه‌گیری

ازآنجاکه باکتری‌های مقاوم به دارو به علت تجویز بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک‌ها ظهور کرده‌اند، به کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز است و پپتیدهای ضدمیکروبی با آثار جانبی کمتر و تأثیر بالاتر و همچنین ایجاد نکردن مقاومت در باکتری می‌توانند جایگزین ارزشمندی را ارائه دهند. پپتیدهای ضدمیکروبی عناصر اصلی سیستم ایمنی ذاتی هستند. این پپتیدها، پپتیدهای کوچکی هستند که به علت حضور لیزین و یا آرژنین در توالی خود، بار مثبت دارند و آمفی‌پاتیک هستند که عامل فعالیت ضدمیکروبی مستقیم این پپتیدها است (۲۱). غشای میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری و قارچ، فسفولیپیدهایی با بار منفی در طرف خارجی غشا دارند که پپتیدهای ضدمیکروبی در اثر تعامل با این غشای دارای بار مخالف، در آن اختلال ایجاد می‌کند و درنتیجه، موجب از بین رفتن میکروب‌ها می‌گردند (۱). یکی از این روش‌های کاربردی برای استفاده از این پپتیدها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک هیبرید و ترکیب کردن پپتیدهای ضدمیکروبی با یکدیگر است که می‌تواند باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی، افزایش محدودهٔ فعالیت ضدمیکروبی روی ارگانیسم‌های مختلف یا افزایش قدرت تمایلی آن‌ها به اندوتوکسین شود، بدون اینکه خاصیت سمیت آن‌ها افزایش چشمگیری داشته باشد (۲۲). بیان نوترکیب پپتیدهای ضدمیکروبی به‌صورت مولتی‌مر یا هیبرید، نوع خاصی از بیان فیوژن است که امکان دسترسی به مقادیر بیشتری از پپتیدهای ضدمیکروبی را فراهم می‌کند (۱۶). دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بیان ژن پپتید S3 به‌صورت مونومر، دیمر، ترامر و اکتامر دریافتند که فرم ترامر آن بیشترین میزان بیان را دارد (۲۳). دربارهٔ پپتید ضدمیکروبی S3 گزارش‌شده است که از میان حالات دیمر، ترامر و اکتامر، بیشترین فعالیت مربوط به فرم ترامر این پپتید است(۲۴). نوآوری تحقیق حاضر در این است که برای افزایش خاصیت ضدمیکروبی پلی‌پپتید S3، از روش هیبریداسیون استفاده شد، به‌طوری‌که دو واحد پپتید S3 سازندهٔ فرم ترامر، با پپتید ضدمیکروبی SΔ3 جایگزین گردید. اتصال‌دهنده‌های پپتیدی گلایسین - 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 ایدهٔ جدیدی برای استفاده از انواع اتصال‌دهنده و مقایسهٔ کارایی آن‌ها در آینده باشد (۲۵). باغ بهشتی و همکاران از این اتصال‌دهنده‌های پپتیدی در بیان نوترکیب پپتید S3 استفاده کردند و مشاهده نمودند که این لینکر در مقایسه با اتصال‌دهنده‌های پپتیدی سخت آسپارتیک اسید- پرولین، باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی پروتئین به‌دست‌آمده گردید (۱۶). در این تحقیق، اثر بیان هیبرید پپتیدهای SΔ3 و S3 با لینکر گلایسین سرین مطالعه شد و برای مطالعهٔ اثر هیبریداسیون، خاصیت ضدمیکروبی و سمیت آن با حالت ترامر S3 مقایسه گردید؛ بنابراین، دو پلی‌پپتید هیبرید و ترامر 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 ترامر، 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 دنبالهٔ هیستیدینی) انجام و بیان آن‌ها تأیید شد. پس از مرحلهٔ بیان در برخی از کلون‌های بیان‌کنندهٔ پلی‌پپتید هیبرید و ترامر، باندهای سنگین‌تر از پروتئین هدف مشاهده گردید که با انجام آزمون وسترن، حضور دنبالهٔ هیستیدینی در این باندها تأیید شد. شکست باندهای دیمر 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 گلایسین سرین از نظر فضایی، امکان نزدیک شدن سیستئین از یک مونومر با مونومر دیگر و درنتیجه، تشکیل پیوند دی‌سولفیدی میان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

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 مطالعهٔ خود، تشکیل باند دی‌سولفیدی میان مونومرهای پپتید S3 و درنتیجه، تشکیل فرم دیمر این پپتید را تأیید کردند. آنان از طریق جایگزینی سیستئین شمارهٔ ۲۷ با سرین در توالی پپتید S3 و مقایسهٔ قدرت اتصال موتانت حاصله به LPS دریافتند که قدرت اتصال پپتید S3 در حالت وجود باندهای دی‌سولفیدی، به‌مراتب 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. همان‌طور که نشان داده شد، مقدار MIC_{GM} توالی هیبریدی از مقادیر متناظر مربوط، نسبت به حالت بیان تترامر و پپتیدهای سازندهٔ آن شامل SΔ3 و S3 به ترتیب باعث بهبود ۳۴، ۲۸ و ۵۷ درصدی بهبودیافته بود. SΔ3 واریانتی از پپتید S3 است که از طریق جایگزینی دو اسید آمینهٔ گلوتامیک اسید و گلایسین با لیزین، بار مثبت خالص آن ۳ بار افزایش یافته و این امر باعث بهبود خاصیت اتصال آن به لیپوپلی‌ساکارید دیوارهٔ باکتری‌های گرم منفی گردیده است (۲۷). در تحقیق حاضر، بیان هیبرید توالی S3 و SΔ3 باعث افزایش بار مثبت خالص پروتئین حاصله (۶+) در مقایسه با حالت تترامر S3 شد. افزایش بار مثبت پپتیدهای ضدمیکروبی عموماً باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی می‌گردد؛ به‌عنوان‌مثال، گزارش‌شده است که تعویض اسید آمینهٔ گلایسین در توالی پپتید ضدمیکروبی alyteserin-2a باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن گردید (۲۸). به‌طور مشابه، در واریانت جدیدی از پپتید S3، حذف بار منفی از توالی این پپتید، به افزایش بار مثبت و درنتیجه، بهبود خاصیت ضدمیکروبی آن منجر شد (۱۳). در تحقیق دیگری، افزودن اسید آمینهٔ لیزین به پپتید ضدمیکروبی magainin باعث افزایش بار مثبت و خاصیت ضدمیکروبی واریانت جدید گردید (۲۹). همین اثر در سایر پپتیدهای ضدمیکروبی نظیر pseudin-2 (۳۰)، temporine (۱۵) و F17 (۱۴) نیز مشاهده شد. در بیان نوترکیب پپتیدهای ضدمیکروبی اعم از بیان فیوژن یا مولتی‌مر، بررسی اثر سمیت پروتئین به‌دست‌آمده یکی دیگر از نکات حائز اهمیت است. همان‌طور که نشان داده شد، پس از ۲۴ ساعت تماس، میزان بقای سلولی در مورد پروتئین هیبرید از پپتیدهای سازندهٔ آن‌ها (S3 و SΔ3) کمتر است و درنتیجه، سمیت توالی هیبریدی در غلظت ۱۲۵ میکرومول از پپتیدهای تشکیل‌دهندهٔ آن حداکثر حدود ۱۱ درصد بیشتر است؛ اما اختلاف حدود ۵ درصد در مقادیر بقای سلولی توالی هیبریدی و تترامر معنا دار نبود و به‌عبارت‌دیگر، سمیت این توالی‌های هیبریدی و تترامر تقریباً یکسان است؛ اما پس از ۴۸ ساعت تماس، اختلاف مشاهده‌شده 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 سازندهٔ آن (SΔ3, S) معنی‌دار بود. همان‌طور که نشان داده شد، میزان بقای سلولی برای هریک توالی ها 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 ضدمیکروبی S3 و SΔ3 در سویهٔ *E.coli* BL 21(DE3) بیان گردید و با میزان بیان و فعالیت بیولوژیک پروتئین نوترکیب تترامر S3 مقایسه شد. مقایسهٔ میزان بیان پروتئین حالت پپتید با حالت تترامر بیانگر این بود که افزایش بار مثبت در پروتئین هیبرید، برای باکتری میزبان اثر سمیت ایجاد نمی‌کند. مقایسهٔ فعالیت ضدمیکروبی این دو پروتئین بیانگر اثر مثبت بیان هیبرید در افزایش خاصیت ضدمیکروبی پروتئین حاصله بود و هرچند 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

بیان هیبرید پلی‌پپتید ضدمیکروبیS3 و SΔ3 راهکار مناسبی برای دستیابی به مقادیر مناسب از پروتئین ضدمیکروبی با خاصیت ضدمیکروبی ارتقایافته است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق

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

References

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides innate immunity and the normally sterile urinary tract. J Am Soc Nephrol2007; 18:2810-6. doi.10.1681/ASN.2007050611
2. 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
3. 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 Microbiol2013; 4:353. doi.10.3389/fmicb.2013.00353
4. 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
5. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli a review. Protein Exp Pur2011; 80:260-7. doi.10.1016/j.pep.2011.08.001
6. 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 Biotechnol2020; 104:2957-72. doi.10.1007/s00253-020-10428-y
7. 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. Peptides2005; 26:721-9. doi. 10.1016/j.peptides.2004.12.016.
8. 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
9. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers property design and functionality. Adv Drug Deliver Rev2013; 65:1357-69. doi.10.1016/j.addr.2012.09.039
10. 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
11. 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
12. 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 Rep2016; 6:27394. doi. 10.1038/srep27394 2016
13. 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 Biotechnol2020; 50:664-72. doi.10.1080/10826068.2020.1725772
14. 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 Chem2012; 287:7738-45. doi.10.1074/jbc.M111.303602
15. 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
16. 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 Ther2021; 27:457-62. doi.10.1007/s10989-020-10095-7
17. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. 2 th ed. Proteom Prot Handbook Totowa New Jersey Springer Publication. 2005; P. 571-607. doi.10.1385/1-59259-890-0:571.
18. Maboudi K, Hosseini SM, Sepahi M, Yaghoubi H, Hadadian S. Production of erythropoietin specific polyclonal antibodies. Iranian J Biotechnol2017; 15:50. doi. doi.org/10.15171/ijb.1413
19. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration of antimicrobial substances. Nat Prot2008; 3:163-75. doi. 10.1038/nprot.2007.521
20. Burns KE, McCleerey TP, Thevenin D. PH selective cytotoxicity of pHLIP antimicrobial peptide conjugates. Sci Rep2016; 6:28465. doi.10.1038/srep28465
21. Cirac A, Torne M, Badosa E, Montesinos E, Salvador P, Feliu L, et al. Rational design of

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]

cyclic antimicrobial peptides based on bpc 194 and bpc198. Molecules2017; 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 Res2018; 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 Chem2004; 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.10.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.60]