

طراحی، کلونینگ، بیان و خالص سازی پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته و بررسی اثرات ضد میکروبی آن

زهرا توکلی^۱، بهناز صفار^{۲،۳*}، کریم مهنام^۴ و روح‌الله همتی^{۲،۴}

^۱ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه سلولی و مولکولی

^۲ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، پژوهشکده زیست فناوری

^۳ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک

^۴ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

پپتیدهای ضد میکروبی اهداف مطلوبی بعنوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید هستند. پپتیدهای هیستاتین، پپتیدهای غنی از اسید آمینه هیستیدین هستند که به یک خانواده از پپتیدهای ضد میکروبی تعلق دارند. هیستاتین ۳ انسانی، از نظر عملکردی هم خاصیت ضد میکروبی و هم خاصیت التیام زخم دارد. در این پژوهش، طراحی جهش پپتید هیستاتین ۳ انجام شد. سپس بمنظور تولید این پپتید در مقیاس آزمایشگاهی، توالی ژنی آن به همراه پپتید الحاقی سومو در باکتری *E. coli* همسانه سازی و بیان شد و پس از آن توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل خالص گردید و نتایج آن با تکنیک SDS-PAGE بررسی شد. نتایج آزمون‌های میکروبی آن (آزمون سنجش MIC)، نشان‌دهنده ارزش این پپتید بوده که بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* که جز پاتوژن‌های بیمارستانی مقاوم به دارو می‌باشد، تاثیرگذار است. با توجه به پژوهش انجام شده، فعالیت ضد میکروبی این پپتید و امکان تولید آن، امید است که از این پپتید در صنایع دارویی و پزشکی، بعنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا در کنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی برای افزایش کارایی آن‌ها، بهره گرفت.

واژه های کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، هیستاتین ۳ جهش یافته، کلون و بیان، خالص سازی، خواص ضد میکروبی

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹، پست الکترونیکی: saffar_b@sku.ac.ir

مقدمه

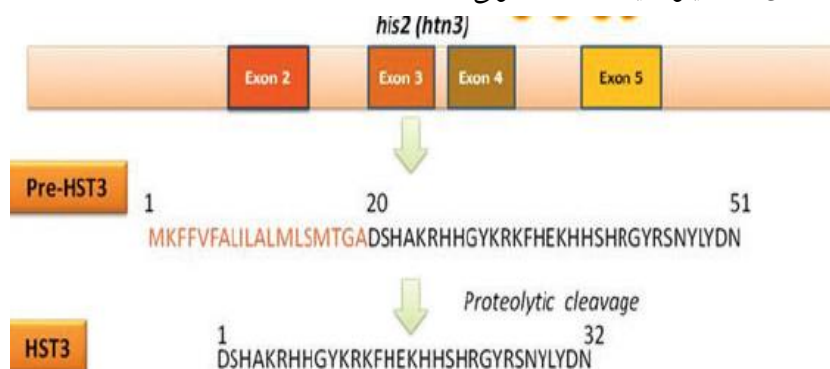
پپتیدهای غنی از هیستیدین بوده که تعداد آمینواسیدهای تشکیل دهنده آنها از ۷ تا ۳۸ متغیر است و با غلظتی حدود ۴۲۵-۵۰ میکرومولار توسط غدد بناگوشی، زیرفکی و زیر زبانی ترشح می‌شوند. این پپتیدها همگی ترکیب آمینواسیدی مشابهی دارند و بنابراین احتمالاً حاصل شکست پروتئولیتیک یک پیش‌ساز بزرگتر بوده‌اند. براساس خصوصیات شیمیایی و توالی آمینواسیدی، پپتیدهای متنوعی از هیستاتین‌ها وجود دارد (۱۲ نوع پپتید هیستاتین)

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)، اجزای سیستم ایمنی ذاتی هستند و اولین خط دفاعی علیه پاتوژن‌های مهاجم را در بسیاری از ارگانیسم‌ها تشکیل می‌دهند. این پپتیدها، ملکولهای دوگانه دوستی (آمفی‌پاتیک) هستند که دارای خصوصیات ضد میکروبی می‌باشند، بهمین دلیل به آنها آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی گفته می‌شود (۲۲).

هیستاتین‌ها یک خانواده از پپتیدهای ضد میکروبی موجود در بزاق انسان و سایر پریمات‌ها هستند. هیستاتین‌ها

۳۰۳۷ دالتون). هیستاتین ۱ و هیستاتین ۳ محصول دو ژن *his1* و *his2* بوده و سایر هیستاتین‌ها محصول هضم پروتئولیتیکی آنها هستند (شکل ۱). ساختار هیستاتین‌ها، بویژه هیستاتین ۳ و ۵، به گونه‌ای است که دارای ساختار مارپیچی در محیط آبگریز و ساختار رندوم کویل در محیط آبی هستند (۱۵).

که همه آنها از دو جایگاه ژنی بر روی باند ۱۳ بازوی بلند کروموزوم ۴ انسانی، منشاء می‌گیرند. رایج‌ترین هیستاتین‌های طبیعی یافت شده در بزاق عبارتند از: هیستاتین ۱ (دارای ۳۸ آمینو اسید و وزن ملکولی تقریباً ۴۹۲۹ دالتون که در رزیدوی سرین-۲ فسفریله است)، هیستاتین ۳ (دارای ۳۲ آمینو اسید و وزن ملکولی ۴۰۶۳ دالتون) و هیستاتین ۵ (دارای ۲۴ آمینو اسید و وزن ملکولی



شکل ۱- شمایی از ژن کدکننده هیستاتین ۳ بزاق انسان (۱۵).

جدی روبرو است: الف) این پپتیدها بطور بالقوه کشنده میزبان باکتریایی تولیدکننده خود هستند. ب) اندازه کوچک آنها نیز باعث تخریب زودهنگام آنها می‌شود. راه‌حل موثر برای غلبه بر این دو مشکل، افزودن یک پروتئین الحاقی به پپتید هدف است که بعداً توسط برش شیمیایی و یا آنزیمی جدا شود (۲۲). یکی از این پروتئین‌های الحاقی، پروتئین‌های سومو (SUMO: Small Ubiquitin-like Modifire) هستند که بدلیل خاصیت چاپرونی باعث افزایش حلالیت، تاخوردگی مناسب پروتئین نو ترکیب و نهایتاً باعث افزایش بیان و فعالیت بیولوژیک آن می‌شود (۱۶،۹).

بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی بصورت طبیعی فعالیت کافی نداشته و بایستی قبل از استفاده از آنها بعنوان عوامل درمانی، بهینه‌سازی شوند. پپتیدهای ضد میکروبی نیز می‌توانند با جایگزین کردن آمینو اسید های مناسب، بهینه شوند (۲۲). یکی از روشهای بهینه سازی ایجاد جهش است، هرچند که جهش‌های ایجاد شده براساس

هیستاتین‌ها اولین بار در ۱۹۷۳ توسط هولبروک و همکارش، به عنوان پپتیدهایی که فعالیت گلیکولیزی میکروارگانسیم‌ها را افزایش می‌دهند، معرفی شدند (۹). در ۱۹۸۸ اوپنهم و همکاران، هیستاتین ۱، ۳ و ۵ را از انسان توسط فیلتراسیون ژلی و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، جداسازی کردند که هر سه هیستاتین خاصیت ضد میکروبی و هم خاصیت التیام زخم دارند (۲۰).

اگر هیستاتین‌ها را به دو گروه دارای خاصیت ضد میکروبی قوی و گروه واجد خاصیت التیام زخم طبقه‌بندی کنیم؛ هیستاتین ۳ حد واسط این دو گروه است. علاوه بر این، تغییرات پس از ترجمه این هیستاتین بحدی اندک است که امکان بیان مطلوب و عملکرد درست را از طریق تولید در میزبان باکتریایی فراهم می‌کند (۲۰، ۱۱). بنابراین هیستاتین ۳ یک پروتئین مطلوب جهت کاربردهای درمانی به شمار می‌رود.

بیان هیستاتین ۳ در سیستم بیانی باکتریایی با دو مشکل

مورد نظر استفاده گردید. پلاسمید pGH و پلاسمید pET-32a (+) بترتیب بعنوان ناقل‌های همسانه سازی و بیانی در باکتری استفاده گردید. آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *HindIII* و آنزیم DNA T4 لیگاز از شرکت تاکارا تهیه شدند. از محیط کشت لوریا برتانی مایع و جامد جهت کشت باکتری استفاده شد. روش‌های مولکولی استفاده شده در این پژوهش بر اساس روش‌های استاندارد می‌باشد (۲۴).

همسانه‌سازی: توالی نوکلئوتیدی کد کننده ژن هیستاتین طبیعی انسانی و پروتئین سومو بترتیب با شماره دسترسی Accession BC095438 و Accession N.Q12306.1 از پایگاه داده ای NCBI بدست آمد. توالی پپتیدی هیستاتین طبیعی و جهش یافته در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGGYRSNYLYDN : پپتید طبیعی=۳۲
 ASHAKRHHWYKRKFHEKHHSRGGYRSNYLYDN : پپتید جهش یافته=۳۲-۱

شکل ۲- توالی پپتیدی هیستاتین طبیعی و جهش یافته. اسیدهای آمینه در موقعیتهای ۱ و ۹ تغییر یافته اند که بصورت ایتالیک نمایش داده شده است.

متصل شدند. در نهایت محصول ایجاد شده جهت بیان پروتئین هدف بدون باکتری (*BL21*) *E.coli* مستعد منتقل شد (۱۸،۲۴). صحت همسانه‌سازی توسط استخراج پلاسمید و برش آنزیمی و نهایتاً از طریق تعیین توالی (توسط شرکت ندای فن) تایید گردید.

بیان و خالص‌سازی: باکتری ترانسفورم شده حاوی پلاسمید نوترکیب، در ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع بمدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس این سوسپانسیون میکروبی به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع منتقل شد تا رشد باکتری‌ها به فاز لگاریتمی برسد (OD ≈ ۰/۵). سپس IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط اضافه شد تا بیان پروتئین هدف در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با دور ۱۰۰rpm القا شود. آنگاه پس از گذشت ۲، ۴، ۶ و ۸

موتانت‌زایی تصادفی بوده و تأثیری در افزایش این خصوصیات نداشته است. درحالی‌که جهش‌های هدفمند بر روی پپتید اعمال می‌شود. بنابراین تلاش برای افزایش خاصیت ضد میکروبی این پپتیدها و یا افزایش پایداری آنها حائز اهمیت است (۱۲). هدف از این پژوهش تولید هیستاتین ۳ جهش یافته در مقیاس آزمایشگاهی با هدف افزایش خاصیت ضد میکروبی آن در مقایسه با آنتی بیوتیک های رایج می‌باشد.

مواد و روشها

در این پژوهش از باکتریهای *E.coli* و *E.coli(DH5a)* *BL21* بترتیب بعنوان ناقل همسانه سازی و ناقل بیانی استفاده شد. از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538)* و باکتری گرم منفی *اشریشیاکولی (ATCC 32218)* نیز برای انجام بررسی خواص ضد میکروبی پپتید

امینواسید آسپارتیک اسید در موقعیت ۱ به آلانین و گلیسین موقعیت ۹ به تریپتوفان تغییر یافت. پس از طراحی و بهینه‌سازی ژن سومو- هیستاتین ۳ جهش یافته از طریق کدون‌های رایج، توالی به همراه جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر *BamHI* در ابتدا و *HindIII* در انتهای آن برای سنتز به شرکت ندای فن ارسال و سپس توالی ژنی مورد نظر توسط همان شرکت در ناقل همسانه‌سازی pGH کلون شد. پس از دریافت، وکتور نوترکیب بدون میزبان باکتریایی *E.coli* سویه *DH5a* که قبلاً مستعد شده بود، منتقل شد. پس از تکثیر ناقل هدف در میزبان، بمنظور بدست آوردن قطعه ابتدا پلاسمید استخراج و بعد توسط آنزیم‌های محدودگر فوق برش داده شد. سپس پلاسمید pET32a(+)*BL21* نیز توسط همین آنزیم‌ها برش داده شد و پس از مجاورت با قطعه هدف، توسط آنزیم لیگاز *T4* بهم

بمدت ۲-۳ ساعت در حمام آب ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت (۱۴). بمنظور خالص سازی قطعه پپتید هیستاتین ۳ جهش‌یافته از سومو، از سانتریکون (Vivaspin, Sartorius) استفاده گردید. بعد از اضافه کردن ۲ میلی لیتر از پروتئین برش یافته به ستون بمدت ۲۰ دقیقه و دور ۴۰۰۰ سانتیفریوژ گردید. محلول عبور کرده از سانتریکون شامل پپتید خالص شده می باشد که جهت سنجش خاصیت ضد میکروبی از آن استفاده گردید. برای سنجش غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده گردید (۵).

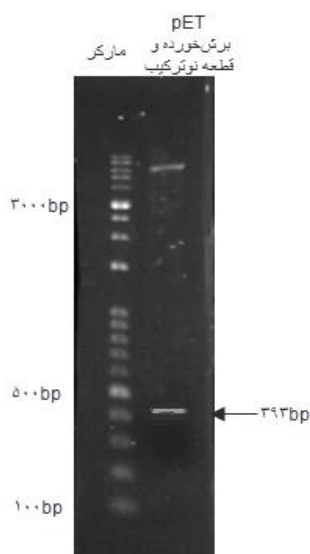
سنجش خاصیت ضد میکروبی: برای سنجش خاصیت ضد میکروبی این پپتید، آزمون میکروبی بررسی کمترین غلظت مهارکننده (Minimum inhibitory concentration (MIC)) از طریق میکروپلیت (ریز رقت سازی) بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538) بعنوان باکتری گرم مثبت و اشریشیاکولی (ATCC32218) بعنوان باکتری گرم منفی، انجام شد. این سویه‌ها در محیط LB مایع بمدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بمنظور تلقیح سوسپانسیون باکتریایی به میکروپلیت ۹۶ خانه، این سوسپانسیون به کدورت ۰/۱ نیم مک‌فارلند رسانده شد. همچنین پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته برش خورده بصورت سریالی در بافر فسفات نمکی ۱۰ میلی مولار رقیق شد. از پروتئین نوترکیب هیستاتین ۳ - سومو برش نخورده به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اضافه کردن حجم مساوی از سوسپانسیون باکتریایی به محلول‌های پپتید، پلیت ۹۶ خانه بمدت ۲۴-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. آخرین خانه‌ای که در آن رشد میکروارگانیسم مهار شد، غلظت آن به‌عنوان MIC گزارش گردید (۶، ۷، ۲).

نتایج

همسانه‌سازی: همانگونه که قبلاً ذکر شد، ابتدا پلاسمید

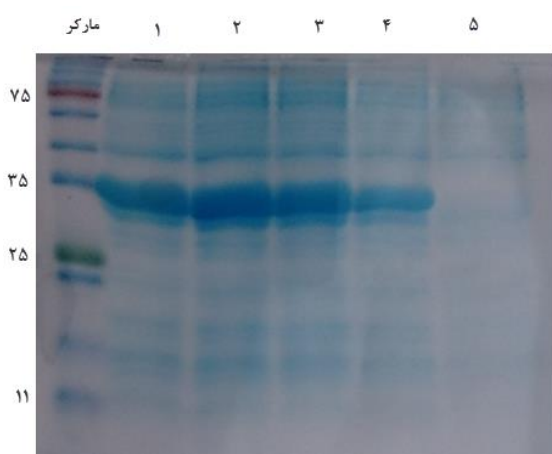
ساعت پس از القاء، از محیط نمونه‌برداری شد و با دور ۵۰۰۰g بمدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شده و پس از خارج کردن محیط رویی، رسوب در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. سلول‌ها در بافر لیز (تریس ۱/۵ مولار با pH=۸، EDTA ۰/۵ مولار با pH=۸، ساکارز ۲۰٪) سوسپانسیون شده و برای ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری گردید. سپس سلول‌ها بروش سونیکاسیون (بمدت ۳۰ ثانیه بدفعات ۴-۵ بار با قدرت ۸۰ و با فاصله زمانی یک دقیقه) شکسته شدند. نمونه‌ها با دور ۶۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰-۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز رویی جهت بررسی الگوی پروتئین‌های کل سلول حاوی پروتئین موردنظر بر روی الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲٪ برده شد (۱۷).

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب در مرحله اول توسط کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل انجام شد. ابتدا به رسوب باکتری حاصل از القای بیان پروتئین هدف، بافر لیز حاوی ایمیدازول با غلظت ۱۰ میلی‌مولار اضافه شد. پس از اضافه کردن رزین ستون نیکل به سوسپانسیون حاصل و قرار دادن آن بر روی ستون تخلیص، بافر شستشو حاوی ایمیدازول با غلظت ۲۰ میلی‌مولار به آن اضافه شد. در نهایت بافر پاکسازی دارای ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار به ستون اضافه شده و خروجی‌های ستون جمع‌آوری شده و جهت بررسی صحت خالص‌سازی بر روی ژل SDS-PAGE برده شد (۲۳). در مرحله دوم، پروتئین توسط دیالیز خالص‌سازی شد تا ایمیدازول آن حذف گردد. بدین منظور محلول پروتئینی پس از قرارگیری در کیسه دیالیز در بافر فسفات نمکی ۱X به‌مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شد (۱). سپس بمنظور حذف قطعه سومو از پپتید، آنزیم سوموپروتئاز استفاده شد. ۲۰ میکروگرم از پروتئین دیالیز شده با ۱۰ میکرولیتر آنزیم سوموپروتئاز و ۱۰ میکرولیتر بافر سوموپروتئاز ترکیب و



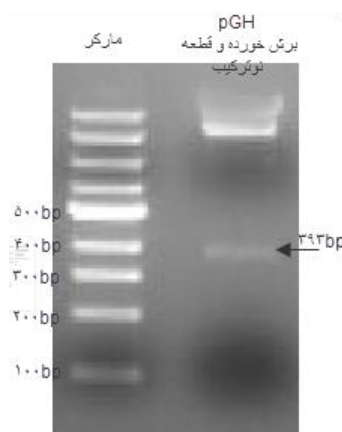
شکل ۴- پلاسمید pET32a(+) و محصول برش آن توسط آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI*

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، پروتئین موردنظر (دارای توالی پپتیدی سومو-هیستاتین ۳ جهش‌یافته و با وزن حدود ۳۲ کیلودالتون) کمی پایین‌تر از باند ۳۵ کیلودالتون دیده می‌شود. نمونه پروتئینی قبل از مرحله القا، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.



شکل ۵- بررسی بیان پروتئین هدف بر روی ژل SDS-PAGE
 (۱.۱۲٪ نمونه پروتئینی ۸ ساعت پس از القا. ۲) نمونه پروتئینی ۶ ساعت پس از القا. ۳) نمونه پروتئینی ۴ ساعت پس از القا. ۴) نمونه پروتئینی ۲ ساعت پس از القا. ۵) پروتئین سلولی قبل از القای بیان به‌عنوان کنترل منفی.

pGH نوترکیب بدرون میزبان باکتریایی ترانسفورم شده و پس از تکثیر، پلاسمید مذکور مجدداً از باکتری استخراج شد. سپس پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدودکننده *BamHI/HindIII* برش داده شده و قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. قطعه برش داده شامل ۳۹۳ جفت باز بود (شکل ۳).



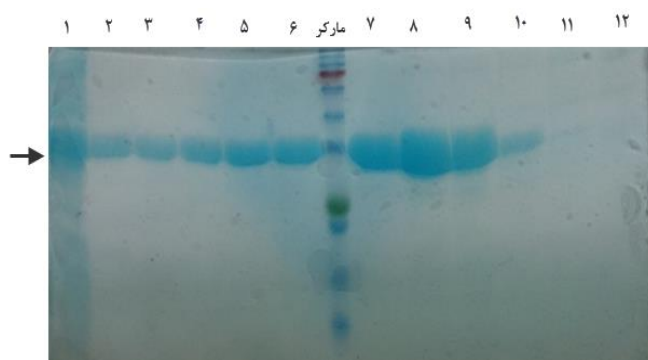
شکل ۳- محصول برش پلاسمید pGH توسط آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII*

قطعه موردنظر از ژل استخراج و به پلاسمید pET32a(+) برش‌خورده با آنزیم‌های محدودکننده *BamHI/HindIII* متصل گردید. پلاسمید نوترکیب ایجاد شده به باکتری *E.coli* ترانسفورم شد. بمنظور تایید همسانه‌سازی تعدادی از کلون‌های باکتری ترانسفورم شده کشت داده شد و سپس پلاسمید نوترکیب از سلول باکتری استخراج و دوباره توسط آنزیم‌های محدودکننده *BamHI/HindIII* برش داده شد. در شکل ۴ تصویر قطعه موردنظر و پلاسمید برش‌خورده حاصل از استخراج پلاسمید یکی از کلون‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داده شده است که صحت همسانه‌سازی را تایید می‌کند.

بیان و خالص‌سازی: بیان پروتئین هدف توسط میزبان باکتریایی پس از همسانه‌سازی پلاسمید نوترکیب صورت گرفت. پس از ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت بعد از القای پروتئین هدف، نمونه‌های پروتئینی استخراج شده به‌مراه نمونه قبل از القا بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برده شد.

پروتئینی مورد نظر اندکی پایین‌تر از باند ۳۵ کیلودالتون قرار دارد.

سنجش غلظت پروتئین با روش برادفورد: غلظت پروتئین هدف در مراحل مختلف توسط روش برادفورد بدست آمد. بیشترین میزان غلظت پروتئین از فراکشن ۵ حاصل از بافر پاکسازی ستون تخلیص بمیزان $1271 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد.



شکل ۶- نتایج خالص‌سازی نمونه‌های پروتئینی حاصل از کروماتوگرافی بر روی ژل ۱۲٪. نمونه‌های ۱ تا ۱۱ فراکشن‌های حاصل از خالص‌سازی با بافر پاکسازی و شماره ۱۲ نمونه کنترل منفی قبل از ستون را نشان می‌دهد. علامت فلش باند ۳۲ کیلودالتونی را مشخص می‌کند.

که بار منفی پپتید کاهش یابد. همچنین تبدیل گلیسین ۹ به تریپتوفان با این هدف صورت گرفت که رزیدوی تریپتوفان، اتصال پپتید به سطح دولایه غشا را تسهیل می‌کند. نهایتاً این تغییرات، فعالیت ضد میکروبی پپتید مورد نظر علیه باکتری‌های گرم مثبت را افزایش می‌دهند (۱۰).

پپتید سومو یکی از پپتیدهای الحاقی بوده که حلالیت و تاخوردگی پپتید هدف را بهبود بخشیده و همانند تیوردوکسین به دلیل اندازه کوچک خود (۱۱/۲ کیلودالتون) باعث افزایش کارایی بیان می‌شود که این خصوصیت به علت نسبت وزنی بالای پپتید به ناقل است. علاوه بر این، وجود آنزیم سوموپروتئاز با اختصاصیت بالا، رهاسازی پپتید هدف را تسهیل می‌کند که یکی از خصوصیات منحصر بفرد این پپتید است. جایگاه برش آنزیم اختصاصی سوموپروتئاز، دو آمینواسید گلیسین انتهایی این فیوژن بوده، به طوری که این آنزیم، پپتید هدف را بدون اضافه یا کم

بررسی خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل: پس از عبور نمونه‌های پروتئینی ۴ و ۶ ساعت پس از القا (شرایط بهینه بیان) از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل، نتایج حاصل، در شکل ۶ بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ قابل مشاهده است که باند

سنجش خاصیت ضد میکروبی: نتایج حاصل از سنجش MIC بدین شرح است: غلظت محلول پپتیدی مورد آزمون درون چاهک‌ها بترتیب کاهش عبارتند از: ۶۰۰، ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵ و ۴/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر. این پپتید بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیاکولی* اثر نداشت اما مقدار MIC برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* $150 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد که نشان‌دهنده تاثیر باکتریواستاتیکی (مهارکنندگی رشد) این پپتید بر روی این باکتری پاتوژن گرم مثبت می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

هیستاتین‌ها پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی و غنی از هیستیدین می‌باشند که بار مثبت این پپتیدها نقش اساسی در تخریب غشای باکتری ایفا می‌کند (۸). در این پژوهش، طراحی جهش در آمینواسیدهای موقعیت آسپاراتات ۱ به آلانین و گلیسین ۹ به تریپتوفان انجام شد. تبدیل آسپاراتات ۱ به آلانین در انتهای آمین باعث می‌شود

نهایت مشخص گردید که آمینواسید های لیزین-۱۳ و آرژنین-۲۲ در توالی هیستاتین ۵، نقشی حیاتی برای فعالیت قارچ‌کشی دارند (۲۷). در سال ۲۰۱۲ برای افزایش فعالیت قارچ‌کشی هیستاتین ۳، از طریق مهندسی ژنتیک، واریانت‌های هیستاتین ۳ با یک، دو، سه یا چهار کپی از دومین عملکردی آن، توسط روش SOE PCR (PCR با رویکرد گسترش قطعات همپوشان) ایجاد شدند (۲۸). در جدول ۱ نتایج MIC این پژوهش با نتایج مطالعات برخی از پپتیدهای ضد میکروبی بر روی باکتری استفاده شده در این پژوهش مقایسه شده است. هرچند این مطالعات بر روی میکروب‌هایی با کد بانکی متفاوت انجام شده، ولی از آنجاییکه جنس و گونه این میکروب‌ها یکسان هستند؛ لذا بررسی نتایج این پژوهش با مطالعات فوق از اهمیت برخوردار است. هرچند که عملکرد پپتید هیستاتین جهش یافته بر روی باکتری های گرم منفی تغییری نکرده است ولی خاصیت ضد میکروبی آن بر علیه باکتریهای گرم مثبت افزایش یافته است. با مقایسه میزان MIC پپتید مورد نظر با آنتی بیوتیک های رایج در درمان بیماریهای ایجاد شده توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، ارزش مطالعه روی این پپتید آشکار می شود.

نتیجه‌گیری کلی

پپتیدهای ضد میکروبی اهداف مطلوبی بعنوان آنتی بیوتیک-های جدید هستند و به دلیل طیف گسترده فعالیت خصوصاً علیه باکتری‌های مقاوم به دارو، مورد توجه قرار می‌گیرند. هیستاتین‌ها به‌عنوان خانواده‌ای از این پپتیدها دارای خصوصیات متنوعی هستند که مهم‌ترین آن‌ها، خاصیت ضد میکروبی علیه سویه‌های مقاوم به دارو است. در این پژوهش، طراحی جهش روی هیستاتین ۳ با هدف افزایش خاصیت ضد میکروبی انجام و سپس بمنظور افزایش بیان این پپتید در مقیاس آزمایشگاهی، توالی ژنی آن به‌همراه پپتید الحاقی سومو در باکتری *E. coli* زیرهمساز سازی و

کردن حتی یک آمینواسید رها می‌کند. همچنین طی مطالعات اخیر نشان داده شده است که استفاده از سومو بمنظور بیان پپتیدهای ضد میکروبی، مقرون به‌صرفه است که این خصوصیت به‌دلیل کارایی بالای سومو در فرار از اثر پروتئازهای داخل سلول می‌باشد. همچنین با پوشش اثرات مخرب پپتیدهای ضد میکروبی، باعث حفاظت میزبان نیز می‌شوند (۱۳، ۲۵). بیان هیستاتین ۳ جهش یافته به‌همراه سومو موجب افزایش بیان پروتئین در مقایسه با کارهای دیگر شده است. در مطالعه‌ای که اینپیم و همکاران بر روی هیستاتین ۳ انجام دادند توانستند، هیستاتین ۳ نو ترکیب را از طریق پپتید الحاقی گلوکاتون ترانسفراز، بمیزان ۳/۲۵ میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری دارای پلاسمید نو ترکیب به‌دست آورند (۱۹). در حالیکه در مطالعه جاری، میزان پروتئین نو ترکیب هیستاتین ۳ جهش یافته به‌همراه پپتید الحاقی سومو و سایر دنباله‌های پروتئینی اضافه‌شده، معادل ۱۲/۷۱ mg/l است.

آزمون MIC نشان داد که پپتید جهش یافته علیه باکتری‌های گرم مثبت بخوبی عمل کرده و منجر به مهار رشد آن‌ها می‌شود ولی اثری بر روی باکتری گرم منفی مشاهده نشد. ایمان و همکاران طی مطالعه‌ای بر روی مکانیسم عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی، بیان کردند که لیپوپلی ساکارید موجود در غشای باکتری‌های گرم منفی، مورد هدف پپتیدهای ضد میکروبی قرار می‌گیرد ولی از آنجائیکه این پلی‌مر در باکتری‌های گرم منفی دچار تغییرات (اضافه شدن قند، پپتید و...) می‌شود، لذا پپتیدهای ضد میکروبی تأثیر کمی بر باکتری‌های گرم منفی می‌گذارند. در مقابل، در باکتری‌های گرم مثبت، اسید تیکوئیک یافت شده که کمتر دچار تغییرات فوق می‌شود، بنابراین اثرات ضد میکروبی پپتیدهای ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است (۲۹). در ۱۹۹۶ برای افزایش فعالیت قارچ‌کشی هیستاتین ۵ از طریق موتانت‌زایی تصادفی، چندین آمینواسید تغییر داده و در میزبان *E. coli* بیان شد و در

بیان شد.

جدول ۱- نتایج MIC این پژوهش و برخی از مطالعات صورت گرفته بر روی پپتیدهای ضد میکروبی.

منبع	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	نوع نمونه آزمون	میکروب
این مطالعه	۱۵۰	پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته	استافیلوکوکوس اورئوس
(۲۱)	>۴۰۰	بوچیتین	
(۲۱)	۲۵۰	پلی میکسین B سولفات	
(۲۱)	>۲۵۰	سیپروفلوکسازین	
(۲۶)	>۲۵۶	کانلیسیدین ها (LL-13, LL-)	
(۴)	۱۰۰۰	آلفا دیفنسین ۱ (HNP-1)	
(۴)	۵۰۰	بتا دیفنسین ۱ (hBD-1)	
(۴)	۲۰۰۰	سفوتاکسیم	

پزشکی، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا درکنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی برای افزایش کارایی آن‌ها، بهره گرفت.

اثر ضد میکروبی این پپتید روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است، ارزش مطالعه روی این پپتید را نشان می‌دهد. امید است که از این پپتید در صنایع دارویی و

منابع

- Andrew SM, Titus JA, Zumstein L. 2001. Dialysis and concentration of protein solutions. *Current Protocols in Immunology A*. 3H. 5.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 5-16.
- Bahar AA, Ren D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 6(12):1543-75.
- Bolatchiev A, Baturin V, Bazikov I, Maltsev A, Kunitsina E. 2019. Effect of Antimicrobial Peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* Clinical Strains in vitro and in vivo. *bioRxiv*. 578278.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2):248-54.
- Cockerill FR. 2012. Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement; [... provides updated tables for... M02-A11 and M07-A9]: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Coyle MB. 2005. Manual of antimicrobial susceptibility testing: BCIT Imaging Services.
- Crusca Jr E, Câmara AS, Matos CO, Marchetto R, Cilli EM, Lião LM, et al. 2017. NMR structures and molecular dynamics simulation of hylin-a1 peptide analogs interacting with micelles. *Journal of Peptide Science*. 23(6):421-30.
- De Smet K, Contreras R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology letters*. 27(18):1337-47.
- Dong W, Mao X, Guan Y, Kang Y, Shang D. 2017. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of three chensinin-1 peptides containing mutation of glycine and histidine residues. *Scientific Reports*. 7:40228.
- Khurshid Z, Najeeb S, Mali M, Moin SF, Raza SQ, Zohaib S, et al. 2016. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications

- in dentistry. Saudi Pharmaceutical Journal. 25:25-31.
- 12- Langham A, Kaznessis YN. 2010. Molecular simulations of antimicrobial peptides. Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols.
- 13- Li Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. Protein expression and purification. 80(2):260-7.
- 14- Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. 2004. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. Journal of structural and functional genomics. 5(1-2):75-86.
- 15- Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. 2014. Histatins: salivary peptides with copper (II) and zinc (II) binding motifs. FEBS Journal. 281(3):657-72
- 16- Mortazavi M, Saffar B, Mirakhorli N, Dehkordi MM. 2014. Design, Synthesis, Molecular Cloning and Expression Evaluation of Wheat (*Triticum aestivum*) Defensin Protein in *E. coli* Host. Iranian Journal of Public Health. 43(2):258
- 17- Novagen: 2003. Novagen pET system manual.
- 18- Old RW, Primrose SB. 1981. Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering: Univ of California Press.
- 19- Oppenheim F, Xu T, McMillian F, Levitz S, Diamond R, Offner G, et al. 1988. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. Journal of Biological Chemistry. 263(16):7472-7
- 20- Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Lendenmann U, Offner GD. 2012. Anti-Candidal activity of genetically engineered histatin variants with multiple functional domains. PloS one. 7(12):e51479
- 21- Oyama LB, Crochet J-A, Edwards JE, Girdwood SE, Cookson AR, Fernandez-Fuentes N, et al. Buwchitin. 2017. A Ruminant Peptide with Antimicrobial Potential against *Enterococcus faecalis*. Frontiers in chemistry. 5:51.
- 22- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. Critical reviews in biotechnology. 32(2):143-71
- 23- Qiagen I, Valencia C. 2003. The QIA Expressionist: A Handbook for High-level Expression and purification of 6× His-tagged Proteins. Qiagen Inc: Chastworth, CA.
- 24- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 25- Satakarni M, Curtis R. 2011. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. Protein expression and purification. 78(2):113-9.
- 26- Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. 2018. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. The Journal of antibiotics. 71(11):971.
- 27- Tsai H, Raj PA, Bobek LA. 1996. Candidacidal activity of recombinant human salivary histatin-5 and variants. Infection and immunity. 64(12):5000-7
- 28- Welling MM, Brouwer CP, van't Hof W, Veerman EC, Amerongen AV. 2007. Histatin-derived monomeric and dimeric synthetic peptides show strong bactericidal activity towards multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. Antimicrob Agents Chemother. 51:3416-3419.
- 29- Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological reviews. 55(1):27-55.

Design, Cloning, expression and purification of mutated Histatin3 and investigation of its antimicrobial effects

Tavakoli Z.¹, Saffar B.^{2,3}, Mahnam K.⁴ and Hemati R.^{3,4}

¹Master of Microbial Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

²Dept. of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

³Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

⁴Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Antimicrobial peptides are desirable targets as new antibiotics. Histatin peptides belong to a family of antimicrobial peptides that are rich in histidine amino acids. Human histatin 3 functionally has both antimicrobial and wound healing properties. In this study, the mutation design of histatin 3 peptide were performed. Then, in order to produce this peptide on a laboratory scale, its sequencing followed by Sumo fusion peptide in *E.coli* was cloned and expressed and then purified by Ni⁺⁺ affinity chromatography technique and the results were analyzed by SDS-PAGE technique. The results of its microbiological tests (MIC) indicate the value of this peptide, which is effective on gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*. According to this research, the antimicrobial activity of this peptide and the possibility of its production, it is hoped to use this peptide in the pharmaceutical and medical industries as new antibiotics or in addition to traditional antibiotics to increase their efficiency.

Key words: Antimicrobial peptides, Mutated Histatin3, cloning & expression, purification, Antimicrobial properties