DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

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[۴و۲]

[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 زیست شناسی

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

چکیده

پپتیدهای ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی و هم خاصیت التیام زخم دارد. در این پژوهش، طراحی جهش پپتید هیستاتین۳ انجام شد. سپس بمنظور تولید این پپتید در مقیاس آزمایشگاهی، توالی ژنی آن به‌همراه 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 برروی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* که جز پاتوژن‌های بیمارستانی مقاوم به دارو می‌باشد، تاثیرگذار است. با توجه به پژوهش انجام شده، فعالیت ضدمیکروبی این پپتید و امکان تولید آن، امید است که از این پپتید در صنایع دارویی و پزشکی، بعنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا درکنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی برای افزایش کارایی آن‌ها، بهره گرفت.

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

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

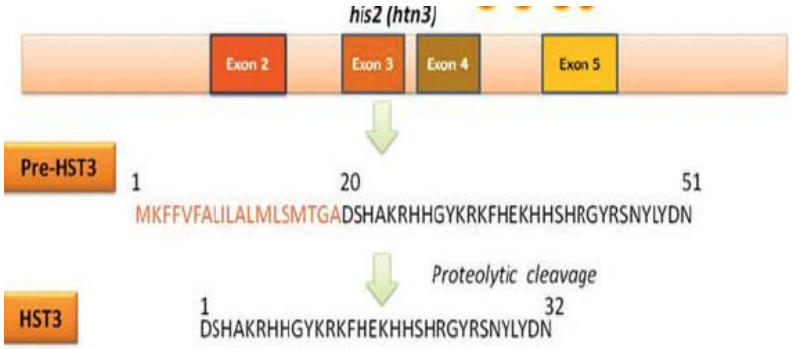
مقدمه

پپتیدهای ضدمیکروبی (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 می شود (۲۲).

هیستاتین‌ها یک خانواده از پپتیدهای ضدمیکروبی موجود در بزاق انسان و سایر پریمات‌ها هستند. هیستاتین‌ها پپتیدهای غنی از هیستیدین بوده که تعداد آمینواسیدهای تشکیل دهنده آنها از ۷ تا ۳۸ متغییر 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 (۱۲نوع پپتید هیستاتین)

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

که همه آنها از دو جایگاه ژنی بر روی باند ۱۳ بازوی بلند کروموزوم ۴ انسانی، منشاء می‌گیرند. رایج ترین هیستاتین‌های طبیعی یافت شده در بزاق عبارتند از: هیستاتین ۱ (دارای ۳۸ آمینواسید و وزن ملکولی تقریبا 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 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).



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

هیستاتین‌ها اولین بار در ۱۹۷۳ توسط هولبروک و همکارش، به‌عنوان پپتیدهایی که فعالیت گلیکولیزی میکروارگانیسم‌ها را افزایش می‌دهند، معرفی شدند (۹). در ۱۹۸۸ اوپنهیم 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 ضدمیکروبی 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 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 بعدا توسط برش شیمیایی و یا آنزیمی جدا شود (۲۲). یکی ازاین پروتئین‌های الحاقی، پروتئین‌های سومو (SUMO: Small Ubiquitin_like Modifire) هستندکه بدلیل خاصیت چاپرونی باعث افزایش حلالیت، تاخوردگی مناسب پروتئین نوترکیب و نهایتا باعث افزایش بیان و فعالیت بیولوژیک آن می شود (۹،۱۶).

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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

موتانت‌زایی تصادفی بوده و تأثیری در افزایش این خصوصیات نداشته است. درحالیکه جهش‌های هدفمند برروی پپتید اعمال می‌شود. بنابراین تلاش برای افزایش خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی آن در مقایسه با آنتی بیوتیک های رایج می باشد.

مواد و روشها

در این پژوهش از باکتریهای *E.coli(DH5α)* و *E.coli 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 مورد نظر استفاده گردید. پلاسمیدpGH و پلاسمید pET-32a (+) بترتیب بعنوان ناقلهای همسانه سازی و بیانی در باکتری استفاده گردید. آنزیم‌های محدودالاثر *Bam*HI و *Hin*dIII 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 می باشد (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 می شود.

پپتید طبیعی ۱=۳۲ :	***D***SHAKRHH***G***YKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
پپتیدجهش یافته ۱-۳۲ :	***A***SHAKRHH***W***YKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN

شکل۲- توالی پپتیدی هیستاتین طبیعی و جهش یافته . اسیدهای آمینه در موقعیتهای ۱و ۹ تغییر یافته اند که بصورت ایتالیک نمایش داده شده است.

امینواسید آسپارتیک اسید در موقعیت ۱ به آلانین و گلیسین موقعیت ۹ به تریپتوفان تغییر یافت. پس از طراحی و بهینه‌سازی ژن سومو- هیستاتین۳ جهش یافته از طریق کدون‌های رایج، توالی به‌همراه جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر *Bam*HI در ابتدا و *Hin*dIII 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 بدرون میزبان باکتریایی *E.coli* سویه *DH5α*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(+) نیز توسط همین آنزیم‌ها برش داده شد و پس از مجاورت با قطعه هدف، توسط آنزیم لیگاز T_4 بهم متصل شدند. درنهایت محصول ایجاد شده جهت بیان پروتئین هدف بدرون باکتری *E.coli (BL21)* مستعد منتقل شد (۲۴،۱۸). صحت همسانه‌سازی توسط استخراج پلاسمید و برش آنزیمی و نهایتاً از طریق تعیین توالی (توسط شرکت ندای فن) تایید گردید.

بیان و خالص‌سازی: باکتری ترانسفورم‌شده 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

ساعت پس از القا، از محیط نمونه‌برداری شد و با دور ۵۰۰۰g بمدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ 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 ۵-۴ 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 سانتریفوژ 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 برروی ستون تخلیص، بافر شستشو حاوی ایمیدازول با غلظت ۲۰ میلی‌مولار به آن اضافه شد. درنهایت بافر پاکسازی دارای ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار به ستون اضافه شده و خروجی‌های ستون جمع‌آوری شده و جهت بررسی صحت خالص‌سازی برروی 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 به‌مدت ۳-۲ ساعت در حمام آب ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت (۱۴). بمنظور خالص سازی قطعه پپتید هیستاتین۳ 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 دور۴۰۰۰ سانتریفیوژ 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).

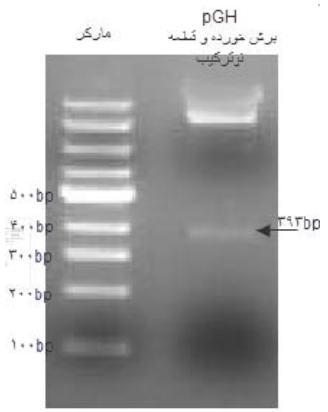
سنجش خاصیت ضدمیکروبی: برای سنجش خاصیت ضدمیکروبی این پپتید، آزمون میکروبی بررسی کمترین غلظت مهارکننده (Minimum inhibitory concentration (MIC)) از طریق میکروپلیت (ریز رقت سازی) بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس (ATCC6538) بعنوان باکتری گرم مثبت و اشریشیاکولی (ATCC32218) بعنوان باکتری گرم منفی، انجام 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 ۰/۰۱ نیم مک‌فارلند رسانده شد. همچنین پپتید هیستاتین۳ جهش یافته برش خورده بصورت سریالی در بافر فسفات نمکی ۱۰ میلی‌مولار رقیق شد. از پروتئین نوترکیب هیستاتین۳ – 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

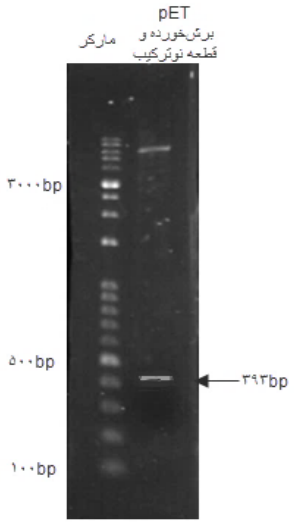
pGH نوترکیب بدرون میزبان باکتریایی ترانسفورم شده و پس از تکثیر، پلاسمید مذکور مجدداً از باکتری استخراج شد. سپس پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدودکننده *Bam*HI/*Hin*dIII برش داده شده و قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. قطعه برش داده شده شامل ۳۹۳ جفت باز بود (شکل ۳).



شکل ۳- محصول برش پلاسمید pGH توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Hin*dIII.

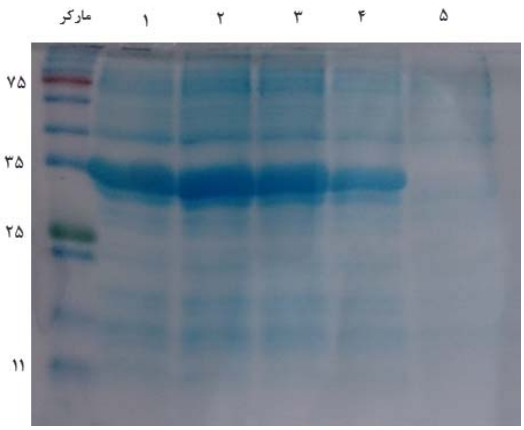
قطعه موردنظر از ژل استخراج و به پلاسمید pET32a(+) برش خورده با آنزیم‌های محدودکننده *Bam*HI/*Hin*dIII متصل گردید. پلاسمید نوترکیب ایجاد شده به باکتری *E.coli* ترانسفورم شد. بمنظور تایید همسانه‌سازی تعدادی از کلون‌های باکتری ترانسفورم‌شده کشت داده شد و سپس پلاسمید نوترکیب از سلول باکتری استخراج و دوباره توسط آنزیم‌های محدودکننده *Bam*HI/*Hin*dIII برش داده شد. در شکل۴ تصویر قطعه موردنظر و پلاسمید برش خورده حاصل از استخراج پلاسمید یکی از کلون‌ها برروی 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 برروی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برده شد.



شکل ۴- پلاسمید pET32a(+) و محصول برش آن توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Hin*dIII.

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 درنظر گرفته شد.

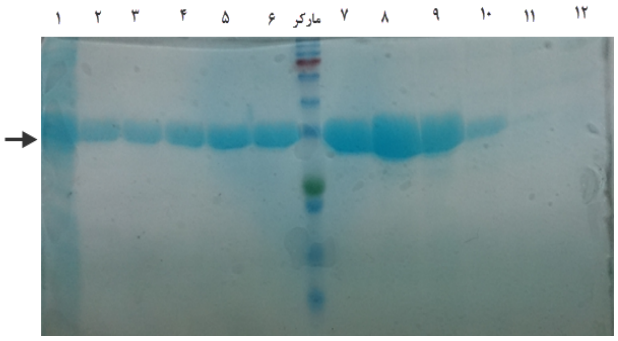


شکل۵- بررسی بیان پروتئین هدف برروی ژل SDS-PAGE ۱۲٪. ۱) نمونه پروتئینی ۸ ساعت پس از القا. ۲) نمونه پروتئینی ۶ ساعت پس از القا. ۳) نمونه پروتئینی ۴ ساعت پس از القا. ۴) نمونه پروتئینی ۲ ساعت پس از القا. ۵) پروتئین سلولی قبل از القای بیان به‌عنوان کنترل منفی.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

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 برروی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ قابل مشاهده است که باند پروتئینی موردنظر 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 ۱۲۷۱ µg/ml بدست آمد.



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

سنجش خاصیت ضدمیکروبی: نتایج حاصل از سنجش MIC بدین شرح است: غلظت محلول پپتیدی مورد آزمون درون چاهک‌ها بترتیب کاهش عبارتند از: 600, ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵و ۴/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر. این پپتید برروی باکتری گرم منفی *اشریشیاکولی* اثر نداشت اما مقدار MIC برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۵۰ µg/mlبدست 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 می باشند که بار مثبت این پپتیدها نقش اساسی در تخریب غشای باکتری ایفا می کند (۸) . در این پژوهش، طراحی جهش در آمینواسیدهای موقعیت آسپارتات ۱ به آلانین و گلیسین ۹ به تریپتوفان انجام شد. تبدیل آسپارتات ۱ به آلانین در انتهای آمین باعث می شود 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. نهایتا این تغییرات، فعالیت ضدمیکروبی 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 به‌دلیل اندازه کوچک خود (۱۱/۲ کیلودالتون) باعث افزایش کارایی بیان می‌شود که این خصوصیت به‌علت نسبت وزنی بالای پپتید به ناقل است. علاوه براین، وجود آنزیم سوموپروتئاز با اختصاصیت بالا، رهاسازی پپتید هدف را تسهیل می‌کند که یکی از خصوصیات منحصربفرد این پپتید است. جایگاه برش آنزیم اختصاصی سوموپروتئاز، دو آمینواسید گلیسین انتهایی این فیوژن بوده، به‌طوریکه این آنزیم، پپتید هدف را بدون اضافه یا کم

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

کردن حتی یک آمینواسید رها می‌کند. همچنین طی مطالعات اخیر نشان داده شده است که استفاده از سومو بمنظور بیان پپتیدهای ضدمیکروبی، مقرون به‌صرفه است که این خصوصیت به‌دلیل کارایی بالای سومو در فرار از اثر پروتئازهای داخل سلول می‌باشد. همچنین با پوشش اثرات مخرب پپتیدهای ضدمیکروبی، باعث حفاظت میزبان نیز می‌شوند (۱۳، ۲۵). بیان هیستاتین۳ جهش یافته به‌همراه سومو موجب افزایش بیان پروتئین در مقایسه با کارهای دیگر شده است. در مطالعه‌ای که اپنهیم و همکاران برروی هیستاتین۳ انجام دادند توانستند، هیستاتین۳ نوترکیب را از طریق پپتید الحاقی گلوتاتیون ترانسفراز، بمیزان ۳/۲۵ میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب به‌دست آورند (۱۹). درحالیکه در مطالعه جاری، میزان پروتئین نوترکیب هیستاتین۳ جهش یافته به‌همراه پپتید الحاقی سومو و سایر دنباله‌های پروتئینی اضافه‌شده، معادل mg/l ۱۲/۷۱ است.

آزمون MIC نشان داد که پپتید جهش‌یافته علیه باکتری‌های گرم مثبت بخوبی عمل کرده و منجربه مهار رشد آن‌ها می‌شود ولی اثری برروی باکتری گرم منفی مشاهده نشد. یمان و همکاران طی مطالعه‌ای برروی مکانیسم عملکرد پپتیدهای ضدمیکروبی، بیان کردند که لیپوپلی‌ساکارید موجود در غشای باکتری‌های گرم منفی، مورد هدف پپتیدهای ضدمیکروبی قرار می‌گیرد ولی از آنجائیکه این پلی‌مر در باکتری‌های گرم منفی دچار تغییرات (اضافه شدن قند، پپتید و...) می‌شود، لذا پپتیدهای ضدمیکروبی تاثیر کمی بر باکتری‌های گرم منفی می‌گذارند. درمقابل، در باکتری‌های گرم مثبت، اسید تیکوئیک یافت شده که کمتر دچار تغییرات فوق می‌شود، بنابراین اثرات ضدمیکروبی پپتیدهای ضدمیکروبی برروی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است (۲۹). در ۱۹۹۶ برای افزایش فعالیت قارچ کشی هیستاتین ۵ از طریق موتانت‌زایی تصادفی، چندین آمینواسید تغییر داده و در میزبان *E.coli* بیان شد و در 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 قارچ کشی 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 ضدمیکروبی برروی باکتری استفاده شده در این پژوهش مقایسه شده است. هرچند این مطالعات برروی 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 بروی باکتری های گرم منفی تغییری نکرده است ولی خاصیت ضدمیکروبی آن برعلیه باکتریهای گرم مثبت افزایش یافته است. با مقایسه میزان MIC پپتید مورد نظر با انتی بیوتیک های رایج در درمان بیماریهای ایجاد شده توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ، ارزش مطالعه روی این پپتید آشکار می شود.

نتیجه‌گیری کلی

پپتیدهای ضدمیکروبی اهداف مطلوبی بعنوان آنتی‌بیوتیک-های جدید هستند و به‌دلیل 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 ضدمیکروبی 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* زیرهمسانه‌سازی و

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

بیان شد.

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

میکروب	نوع نمونه آزمون	MIC (µg/ml)	منبع
استافیلوکوکوس اورئوس	پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته	۱۵۰	این مطالعه
	بوچیتین	>۴۰۰	(۲۱)
	پلی میکسین Bسولفات	۲۵۰	(۲۱)
	سیپروفلوکسازین	>۲۵۰	(۲۱)
	کاتلیسیدین‌ها (LL-13، LL-17)	>۲۵۶	(۲۶)
	آلفا دیفنسین ۱ (HNP-1)	۱۰۰۰	(۴)
	بتا دیفنسین ۱ (hBD-1)	۵۰۰	(۴)
	سفوتاکسیم	۲۰۰۰	(۴)

اثر ضد میکروبی این پپتید روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس که از* باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک است، ارزش مطالعه روی این پپتید را نشان می دهد. امید است که از این پپتید در صنایع دارویی و پزشکی، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا درکنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی برای افزایش کارایی آن‌ها، بهره گرفت.

منابع

1- Andrew SM, Titus JA, Zumestein L. 2001. Dialysis and concentration of protein solutions. Current Protocols in Immunology A. 3H. 5.

2- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial Chemotherapy. 5-16.

3- Bahar AA, Ren D. 2013.Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals. 6(12):1543-75.

4- 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.

5- 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.

6- 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.

7- Coyle MB. 2005. Manual of antimicrobial susceptibility testing: BCIT Imaging Services.

8- 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.

9- De Smet K, Contreras R.2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. Biotechnology letters. 27(18):1337-47

10- 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.

11- Khurshid Z, Najeeb S, Mali M, Moin SF, Raza SQ, Zohaib S, et al. 2016. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

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 (Triticumaestivum) 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 Ruminal 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.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.5.9

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]

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

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

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

[4] **Dept. 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