

## بررسی نظری و تجربی جهش‌های جدید در پپتید هیستاتین ۳ به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی آن

زهرا توکلی<sup>۱</sup>، بهناز صفار<sup>۲،۳</sup>، کریم مهنام<sup>\*۲،۴</sup>، روح اله همتی<sup>۲،۵</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، <sup>۲</sup> پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، <sup>۳</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، <sup>۴</sup> گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

مسئول مکاتبات: کریم مهنام mahnam.karim@sku.ac.ir

**چکیده.** یکی از بحران‌های آینده نزدیک بشریت همه‌گیری بیماری‌های عفونی بعلت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها است. پپتیدهای خانواده هیستاتین دارای خصوصیت ضد میکروبی علیه سویه‌های مقاوم به دارو و التیام زخم می‌باشند. هدف از این پژوهش طراحی یک جهش برای افزایش خاصیت ضد باکتری پپتید هیستاتین ۳ بود. در این پژوهش، ابتدا پپتید هیستاتین ۳ توسط برنامه گرومکس ۵ به مدت ۵۰ نانوثانیه در حضور آب و یون‌ها و همچنین در حضور میسل SDS به عنوان مدل غشا باکتری شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. سپس به منظور افزایش خاصیت ضد باکتری هیستاتین ۳، هشت جهش مختلف در این پپتید طراحی و ساختار آنها تهیه شد و هر کدام با همان شرایط قبل بطور جداگانه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شدند و انرژی آزاد اتصال پپتیدها با میسل SDS با روش MM/PBSA محاسبه شد. در نهایت ۹۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در شرایط ذکر شده نشان داد که جهش ترکیبی DIA-G9W دارای منفی‌ترین انرژی آزاد اتصال به میسل SDS است که نشان‌دهنده میانگین بهتر این جهش با غشا باکتری است. نتایج بررسی‌های آزمون‌های میکروبی MIC این جهش بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، نشان از افزایش خاصیت ضد میکروبی آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد برای طراحی جهش به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی پپتیدها هردوی کاهش بار منفی پپتید و افزایش خاصیت هیدروفوبیسیته باید در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** آزمون MIC، انرژی اتصال MM/PBSA، پپتیدهای ضد میکروبی، جهش، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

### Theoretical and Experimental Investigation of New Mutations in Histatin 3 Peptide to Increase its Antimicrobial Property

Zahra Tavakoli<sup>1</sup>, Behnaz Saffar<sup>2,3</sup>, Karim Mahnam<sup>\*2,4</sup>, Rohollah Hemati<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> MSc degree of microbial biotechnology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, <sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, <sup>3</sup> Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, <sup>4</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Corresponding author: Karim Mahnam, mahnam.karim@sku.ac.ir

**Abstract.** A significant future challenge for humanity is the rise of infectious disease epidemics stemming from bacterial antibiotic resistance. The Histatin family exhibits antimicrobial properties against drug-resistant strains and promotes wound healing. This study aimed to engineer a novel mutant of Histatin 3 to enhance its antimicrobial efficacy. Initially, molecular dynamics simulations of Histatin 3 were conducted in the presence of water molecules and ions, as well as a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) micelle, which serves as a model for bacterial membranes, using the GROMACS 5 software for a duration of 50 ns. Subsequently, to augment antibacterial properties, eight mutations were designed, and their structures were prepared, followed by individual MD simulations under the same conditions for each mutation. The binding free energy of the peptides with the SDS micelle was calculated using the MM/PBSA method. Ultimately, 950 ns MD simulation revealed that the DIA-G9W mutation exhibited the most favorable binding free energy to the SDS micelle, indicating enhanced interaction of this mutant with microbial membranes. Both this peptide and the wild-type Histatin 3 were synthesized, and their antimicrobial properties were assessed experimentally. The microbiological tests (MIC) on gram-negative and gram-positive stains demonstrated that this peptide was effective against gram-positive bacteria. The findings of this research suggest that, in designing mutations to enhance antimicrobial properties, attention should be given to both the reduction of negative charge and hydrophobicity.

**Key words.** Antimicrobial peptides, Molecular Dynamics simulation, MIC test, mutation, MM/PBSA binding energy

Received 14.08.2023/ Revised 10.12.2024/ Accepted 10.12.2024/ Published 21.12.2024

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳، اصلاح: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰، پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰، انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰

## مقدمه

باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها نشان داده‌اند. تحقیقات حاکی از آن است که این پتیدها در برابر استرپتوکوکوس موتانس، پورفیروموناس ژنژیوا لیس، اکتینوباسیلوس اکتینوماستیم کومیتانس، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا مؤثر هستند. این پتیدها که عمدتاً در بزاق انسان وجود دارند، نقش مهمی در حفظ سلامت دهان ایفا می‌کنند و با هدف قرار دادن باکتری‌های پاتوژن، می‌توانند ریسک ابتلا به پوسیدگی دندان و بیماری‌های لثه را کاهش دهند (Hajishengallis and Russell, 2015).

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، ابزاری مهم برای فهم اساس فیزیکی ساختار و عملکرد ماکرومولکول‌های زیستی است. شبیه‌سازی‌ها جزئیاتی را درباره حرکات اتم‌های یک مولکول در زمان‌های مختلف ارائه می‌کند. غالباً انجام آزمایشات بر روی مولکول واقعی دشوار است، بنابراین شبیه‌سازی با دادن اطلاعاتی در مورد مدل مولکولی، آسان‌تر از آزمایش تجربی است و باعث صرفه‌جویی در منابع مالی و زمان می‌شود. اگرچه پارامترهایی که در شبیه‌سازی استفاده می‌شوند تقریبی بوده اما تحت کنترل کاربر و قابل تنظیم هستند البته آزمایشات تجربی نقشی اساسی در تأیید روش‌های شبیه‌سازی ایفا می‌کنند (Karplus & McCammon, 2002). هدف از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پتیدهای ضد میکروبی، یافتن روشی است که پتید مورد نظر باکتری را نابود می‌کند و همچنین گسترش مدل‌های قابل پیش‌بینی است که می‌توانند برای طراحی پتیدهای ضد میکروبی بالقوه و غیرسمی استفاده شوند (Langham & Kaznessis, 2010).

یکی از راه‌های بررسی عملکرد پتیدهای ضد میکروبی شبیه‌سازی آنها در حضور آب و میسل‌ها بعنوان مدل غشا است. شبیه‌سازی در میسل به دلیل اندازه کوچکتر و زمان استراحت کمتر میسل نسبت به دولایه لیپیدی (حدود ۱۰۰۰-۵۰۰ پیکوثانیه برای میسل و ده‌ها نانوثانیه برای دولایه لیپیدی)، به زمان و مصرف منابع کمتری نیاز دارد. مطالعات دینامیک مولکولی برای بسیاری از انواع میسل‌ها انجام شده است که عبارتند از: میسل‌های آنیونی مانند میسل‌هایی که از سدیم دو سدیل سولفات (SDS) تشکیل شده‌اند؛ میسل‌های خنثی مانند دودسیل فسفوکولین (DPC) و میسل‌های ترکیبی. میسل‌های DPC به‌عنوان مدل‌های قابل قبول غشاهای سلول یوکاریوتی، که عموماً غنی از فسفولیپیدهای خنثی هستند، در نظر گرفته می‌شوند. میسل‌های SDS مدلی برای غشای باکتری‌ها می‌باشند زیرا دارای سطح خارجی آنیونی و سطح داخلی هیدروفوب هستند. تفاوت در رفتار پتیدها در مقابل میسل SDS و میسل DPC

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح دنیا باعث مقاومت بسیاری از باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی شده است، و این مساله روند درمان بیماری‌های عفونی را در آینده نزدیک در جهان با یک بحران مواجه خواهد کرد (Seo et al., 2012; Wang et al., 2015). مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از پتیدهای ضد میکروبی است زیرا این پتیدها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی مرسوم، کمتر مستعد القای مقاومت هستند، این پتیدها به‌طور هم‌زمان می‌توانند روی چندین هدف اثر بگذارند (Pasupuleti et al., 2012; Karimi et al., 2014).

هیستاتین‌ها پتیدهای منحصر به فرد کاتیونیک، غنی از هیستیدین و متعلق به خانواده‌ای از پتیدهای بزاقی انسان هستند که توسط غدد بناگوشی، زیرفکی و زیر زبانی ترشح می‌شوند و قدرت ضد باکتریایی، ضدقارچی و التیام‌زخم دارند. علاوه بر آن هیستاتین‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم‌های پروتئازی و کلاژنازی در درمان بیماری‌های گوارشی، دهان و دندان کاربرد دارند. اخیراً تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهند که هیستاتین‌ها به‌هنگام ایجاد زخم به‌عنوان فاکتورهایی عمل کرده که موجب فراخوانی سلول‌ها و عوامل التیام‌زخم می‌شوند. اساس طبقه‌بندی آن‌ها بر مبنای وزن مولکولی است. هیستاتین‌های ۱، ۳ و ۵ به ترتیب دارای ۳۳، ۳۲ و ۲۴ اسید آمینه هستند. در میان هیستاتین‌ها، خصوصیات هیستاتین ۳ و ۵ از نظر خواص ضد میکروبی قوی قابل ملاحظه می‌باشد. ساختار آن‌ها به‌گونه‌ای است که از یک ساختار مارپیچی در محیطی آب‌گریز تشکیل یافته‌اند که در میان آن‌ها هیستاتین ۵ قوی‌ترین پتید و هیستاتین ۱ ضعیف‌ترین پتید می‌باشد. این توانایی به‌علت ماهیت بازی یا بار مثبت این پتیدها می‌باشد. به‌نوعی که هیستاتین ۵ دارای بیشترین بار بار مثبت است و در ایجاد اختلال در غشای باکتری‌ها قوی‌ترین عملکرد را دارد. از طرفی خاصیت کلیدی دوم هیستاتین‌ها القای التیام‌زخم می‌باشد. خصوصیت التیام‌زخم هیستاتین‌ها توسط انتهای کربوکسیلی این پتیدها اعمال می‌شود که بویژه در هیستاتین ۱ و ۳ دیده می‌شود. لذا با توجه به خصوصیت دوگانه هیستاتین ۳ نقش موثر و قوی در فعالیت ضد میکروبی و نیز خاصیت التیام‌زخم، آن را نامزد مناسبی برای مطالعات بیشتر جهت تولید یک پتید درمانی با خواص چندگانه می‌کند (Akula et al., 2023; Golshani et al., 2023; Kubo et al., 2023).

(Khurshid et al., 2016; Welling et al., 2007). هیستاتین‌ها فعالیت‌های مهارتی و ضد میکروبی را علیه انواع مختلفی از

گرفته شد. شبیه سازی توسط بسته نرم افزاری گرومکس ۵ در جعبه مکعب مستطیل با حدود ۱۵ هزار مولکول آب با مدل آب Tip4p انجام شد. کیا و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی مطالعه‌ای بر روی پپتید ضد میکروبی سکروپین، نشان دادند که میدان نیروی چارم ۲۷ نتایج قابل قبولی دارد (Kia & Darve, 2013). بنابراین در این مطالعه نیز از میدان نیروی چارم ۲۷ استفاده شد. بار کل پپتید +۸e بود، زیرا پپتید حاوی باقیمانده‌هایی با بار مثبت است. به منظور ایجاد قدرت یونی ۱۴۰ میلی مولار و خنثی کردن بار کل ملکول در شبیه سازی تعداد مناسبی یون سدیم و یون کلر به سامانه اضافه شد. در ابتدا کمینه سازی با الگوریتم کاهش پرشیب و شیب مزدوج انجام شد. سپس با ثابت نگه داشتن موقعیت اتم‌های پپتید، به مولکول‌های حلال، اجازه حرکت و قرارگیری آنها در خلل و فرج ساختار پپتید داده شد این مرحله با هنگرد NVT به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه و با هنگرد NPT به مدت ۲۰۰۰ پیکوثانیه با گام زمانی ۲ فمتوثانیه، انجام شد تا سامانه از نظر حجم و فشار به تعادل برسد. در مرحله نهایی یا مرحله تولید شبیه سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NPT به مدت ۵۰ نانوثانیه با گام زمانی ۲ فمتوثانیه انجام شد. پس از پایان شبیه سازی، آنالیز نتایج با دستورات آنالیز بسته نرم افزاری گرومکس انجام شد.

در مرحله بعد ابتدا فایل PDB و توپولوژی میسل SDS با ۶۰ مولکول SDS از وبگاه <http://bioinf.modares.ac.ir/software/mb2/> با میدان نیروی چارم ۲۷ گرفته شد و به مدت ۵۰ نانوثانیه با حدود ۱۹ هزار مولکول آب و ۱۵۰ یون منیزیم و ۱۵۰ یون کلر شبیه سازی شد. میسل SDS بار ۶۰e- دارد. سپس ساختار نهایی پپتید وحشی که از شبیه سازی در آب بدست آمده بود به کمک برنامه VMD (Humphrey et al., 1996) در مجاورت ساختار نهایی میسل SDS که آن هم از شبیه سازی بدست آمده بود، قرار داده شد تا فایل ورودی برای شبیه سازی کمپلکس بدست آید. مراحل شبیه سازی کمپلکس مانند شبیه سازی پپتید در آب بود. تعداد مولکول‌های آب حدود ۹ هزار عدد و تعداد یون سدیم و کلر هم بسته به بار پپتید متفاوت بود و به ترتیب حدود ۱۱۰ و ۵۵ عدد بود.

### ایجاد جهش در پپتید

به منظور ایجاد جهش از پیشنهادات مقالات در زمینه جهش‌هایی که منجر به تقویت خاصیت ضد میکروبی پپتید هیستاتین ۳ وحشی

(DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN)

می شود، استفاده شد و هشت جهش به شرح زیر تهیه شد:

۱. (تبدیل گلیسین ۲۳ به آلانین (G23A)  
(DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRAYRSNYLYDN):

اساسی برای مطالعه فعالیت و سمیت پپتیدهای ضد میکروبی فراهم می‌کند (Langham & Kaznessis, 2010). شبیه سازی دینامیک مولکولی جذب پپتیدها توسط میسل SDS می‌تواند قدرت ضد میکروبی پپتیدها را نشان دهد. شبیه سازی این فرآیندها، فهم دقیق‌تری از سازوکار عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی ارائه می‌کند.

شواهد به دست آمده نشان می‌دهد که هیستاتین‌ها به طور معمول دارای خاصیت بازی و بار مثبت هستند، بنابراین فسفولیپید اسیدی در معرض سطح غشای باکتری را شناسایی کرده و از طریق تغییر بار غشای باکتری باعث اختلال در غشای سلولی باکتری‌ها شده و از این طریق خاصیت ضد میکروبی خود را نشان می‌دهند. با ایجاد جهش در پپتید مورد نظر به نحوی که کاهش همزمان بار منفی پپتید و افزایش هیدروفوبیسیته رخ دهد می‌تواند باعث تسهیل واکنش پپتید مورد نظر با غشا شده و تخریب غشا و مرگ باکتری را به همراه دارد (Skog et al., 2023).

هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت ضد میکروبی چند پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته و وحشی به کمک روش شبیه سازی دینامیک مولکولی در حضور میسل SDS و سپس بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید به صورت تجربی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### بخش نظری

ساختار سه بعدی پپتید هیستاتین ۳ (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN) در بانک RCSB موجود نیست، بنابراین ساختار سه بعدی آن توسط نرم افزار هایپرکم ۸ تهیه شد. ابتدا با کمک گرفتن از سرور [prabi\(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_phd.html\)](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html) هم‌چنین سرور <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4> ساختار دوم پپتید هیستاتین ۳ تعیین شد، نتایج نشان داد که این پپتید عمدتاً به فرم پیچ تصادفی بوده و فقط در موقعیت باقیمانده‌های ۱۶-۱۲ به صورت مارپیچ آلفا درمی‌آید. بنابراین برای تهیه ساختار پپتید با برنامه هایپرکم ۸ این نکته رعایت شد. سپس ساختار رسم شده با الگوریتم کاهش پرشیب با شیب ۰/۱ کیلوکالری برانگستروم مول کمینه شد و ساختار با فرمت PDB ذخیره و با برنامه دیسکاواری استودیو (Accelrys, San Diego, CA, US) بررسی شد.

### شبیه سازی پپتید در آب و در حضور میسل SDS

ساختار PDB پپتید که با برنامه هایپرکم ۸ ساخته شده بود، به عنوان پرونده ورودی برای شبیه سازی دینامیک مولکولی در نظر

و دومین جهش ترکیبی، تبدیل آسپاراتات ۱ به هیستیدین و گلیسین ۲۳ به آلانین (D1H-G23A) (HSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRAYRSNYLYDN) و سومین جهش ترکیبی، تبدیل آسپاراتات ۱ به هیستیدین و گلیسین ۹ به تریپتوفان (D1H-G9W) (HSHAKRHHWYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN) بود. بنابراین در مجموع ۸ جهش تهیه شد و هم به تنهایی و هم در حضور آب و میسل SDS بطور جداگانه شبیه سازی شدند. برای تهیه جهش‌ها از ساختار نهایی ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی پپتید وحشی در آب استفاده شدند. تعداد مولکولهای آب و یون‌ها هم در کمپلکس پپتیدهای جهش یافته و میسل SDS مشابه کمپلکس پپتید وحشی بود.

پس از اتمام شبیه سازی پپتیدها در حضور میسل SDS، فاصله مرکز جرم پپتیدها تا مرکز جرم میسل در طول شبیه سازی و ... محاسبه شد. همچنین انرژی اتصال پپتیدها به میسل SDS از بوسیله اسکریپت g\_mmpbsa (Kumari et al., 2014) محاسبه شد. همچنین سهم انرژی تک تک باقیمانده‌ها در اتصال به میسل SDS مشخص شد (Sayyed-Ahmad et al., 2009).

### بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدها

خاصیت همولیتیکی یا سمیت پپتیدها کم و بیش وابسته به خواص فیزیکوشیمیایی آنها از قبیل طول پپتید و بار الکتریکی و دوگانه دوستی و هیدروفوبیسیته آنها دارد. بنابراین این خواص برای پپتیدهای مطالعه شده در این تحقیق توسط چند سرور بیوانفورماتیکی محاسبه شد (جدول ۱).

سمیت پپتیدها و وزن مولکولی و بار الکتریکی آنها بوسیله وبگاه toxinpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>) تعیین شد. هیچکدام از پپتیدها خاصیت سمی نداشتند و همگی توسط این سرور بعنوان پپتیدهای غیرسمی تشخیص داده شدند. خاصیت همولیتیکی پپتیدها که با امتیاز PROB محاسبه می شود نشان می دهد که خاصیت همولیتیکی این پپتیدها همگی متوسط و کمتر از متوسط است. هر چه امتیاز PROB به یک نزدیکتر باشد خاصیت همولیتیکی بیشتر و هر چه به صفر نزدیکتر باشد غیرهمولیتیک است. این نتایج با انتظار ما هماهنگ است زیرا پپتید هیستاتین وحشی در بزاق انسان وجود دارد و خاصیت سمی ندارد.

همچنین خاصیت آنتی ژنیستی پپتیدها توسط سرور (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) بررسی شد. خاصیت آنتی ژنیستی همه پپتیدها تقریباً برابر بود و هیچکدام از پپتیدها حاوی باقیمانده‌های آنتی ژن نبودند.

علت انتخاب این جهش این بود که در مقالات ذکر شده بود آلانین می تواند خاصیت هیدروفوبیسیته و فعالیت ضد میکروبی پپتیدها را زیاد کند (Chen et al., 2005).

۲. (تبدیل فنیل آلانین ۱۴ به ایزو لوسین (F14I) (DSHAKRHHGYKRKIHEKHSHRGYRSNYLYDN): باقیمانده‌ها با زنجیره جانبی آلیفاتیک بلند مانند والین، لوسین، ایزولوسین و گلوتامین می توانند منجر به افزایش خاصیت هیدروفوبی و ضد میکروبی شوند. همچنین تغییر باقیمانده‌های جایگاه‌های وسط و جوه هیدروفوبی و هیدروفیلی می تواند منجر به افزایش خاصیت دوگانه دوستی شود (Kim et al., 2013).

۳. (تبدیل آسپاراتات ۱ به هیستیدین (D1H) (HSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN): کرو سکا و همکاران برای پپتید ضد میکروبی هایلین (Hylin-a1) سه آنالوگ شبیه سازی کردند که هر سه در انتهای آمین (N-terminal) تغییر داده شدند. به انتهای آمین آن‌ها به ترتیب گروه استیل (گروه خنثی)، لیزین (بار مثبت) و آسپاراتات (بار منفی) اضافه شده و برهمکنش آنها با میسل بررسی و مشخص شد که انتهای آمین نباید بار منفی داشته باشد و آنالوگی که لیزین در انتهای آن قرار داشت بالاترین تعداد برهمکنش با میسل داشته و بیشترین فعالیت ضد میکروبی را نشان می دهد و پس از آن پپتید مشابهی که دارای گروه استیل بود خاصیت ضد میکروبی قوی تری را نشان می دهد (Crusca et al., 2017)، بنابراین آسپاراتات ۱ در انتهای پپتید هیستاتین ۳ که دارای بار منفی است به هیستیدین تغییر یافت.

۴. (تبدیل آسپاراتات ۱ به آلانین (D1A) (ASHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN): مطالعه کرو سکا و همکاران نشان داد تغییر آسپاراتات انتهای آمین به آلانین می تواند فعالیت ضد میکروبی پپتید را زیاد کند (Crusca et al., 2017).

۵. (تبدیل گلیسین ۹ به تریپتوفان (D9W) (DSHAKRHHWYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN): باقیمانده تریپتوفان، به واسطه برهمکنش با ناحیه سطحی غشای سلول، اتصال پپتید به سطح دولایه را تسهیل می کند و فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت را افزایش می دهد (Dong et al., 2017). بنابراین گلیسین ۹ را به تریپتوفان جهش دادیم.

سپس با بررسی نتایج آنالیزهای این پپتیدها و پس از انتخاب بهترین و موثرترین جهش‌ها، سه جهش ترکیبی هم تهیه و شبیه سازی شد. این جهش‌های ترکیبی هر کدام حاوی دو جهش بودند. اولین جهش ترکیبی، تبدیل آسپاراتات ۱ به آلانین و گلیسین ۹ به تریپتوفان (D1A-G9W) (ASHAKRHHWYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN)

محاسبه شد. این خاصیت یک خاصیت مهم در پپتیدهای ضد باکتری است و از هیدروفوبیسیته مهم تر است (<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115896>). این خاصیت از یک طرف منجر به میانکنش الکتروستاتیک با سر منفی فسفولیپید غشا می شود و از طرف دیگر باعث میانکنش هیدروفوب با قسمت های غیرقطبی میسل یا غشا می شود. نتایج جدول ۱ نشان داد که خاصیت دوگانه دوستی همه پپتیدها مناسب بود. پپتیدهای G9W-mut و هر سه جهش ترکیبی خاصیت دوگانه دوستی بیشتری از پپتید وحشی داشتند. نتایج جدول ۱ انتخاب مناسب جهشها را تایید می کند و در مرحله بعد بایستی مشخص شود کدام یک از این جهشها میانکنش مناسب تری با میسل SDS دارند.

همچنین خاصیت آلرژی زایی پپتیدها توسط سرور (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP>) محاسبه شد و هیچکدام از پپتیدها آلرژی زا نبودند و همگی غیرآلرژن بودند. پارامتر GRAVY یا هیدروپاتی (hydropathy) همه پپتیدهای منفی بود که به معنی خاصیت آبدوستی آنها و توانایی حلالیت آنها است. درصد باقیماندهای بازی در همه پپتیدها زیاد و مشابه است که با بار الکتریکی مثبت آنها هماهنگ است و می تواند منجر به میانکنش الکتروستاتیک پپتیدها به میسل SDS یا اتصال به غشا باکتری شود. خاصیت دوگانه دوستی یا Amphiphilicity پپتیدها نیز توسط سرور (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hemopi/batch.php>)

جدول ۱- خواص فیزیوشیمیایی پپتیدهای مطالعه شده در این تحقیق

Table 1. The physicochemical properties of all studied peptides in this research

| وزن مولکولی (دالتون) | آنتی ژنیسیته | دوگانه دوستی | بار کل (بر حسب e) | هیدروفوبیسیته | درصد باقیمانده های بازی | GRAVY | PROB Score | پپتید        |
|----------------------|--------------|--------------|-------------------|---------------|-------------------------|-------|------------|--------------|
| ۴۰۶۲                 | ۰/۹۹         | ۱/۷۵         | ۸                 | ۰/۵۲          | ۴۷                      | -۲/۲۹ | ۰/۳۶       | وحشی         |
| ۴۰۷۶                 | ۱            | ۱/۷۵         | ۸                 | ۰/۵۱          | ۴۷                      | -۲/۲۳ | ۰/۴        | G23A-Mut     |
| ۴۰۲۸                 | ۰/۹۹         | ۱/۷۵         | ۸                 | ۰/۵۵          | ۴۷                      | -۲/۲۴ | ۰/۳۷       | F14I-mut     |
| ۴۰۸۴                 | ۱            | ۱/۸          | ۱۰                | ۰/۴۲          | ۵۰                      | -۲/۲۹ | ۰/۳۲       | D1H-mut      |
| ۴۰۱۸                 | ۱            | ۱/۷۵         | ۹                 | ۰/۴۲          | ۴۷                      | -۲/۱۳ | ۰/۳۷       | D1A-mut      |
| ۴۱۹۲                 | ۰/۹۹         | ۱/۹۷         | ۸                 | ۰/۴۲          | ۴۷                      | -۲/۳۱ | ۰/۴        | G9W-mut      |
| ۴۱۴۸                 | ۱            | ۱/۹۷         | ۹                 | ۰/۳۱          | ۴۷                      | -۲/۱۵ | ۰/۴        | D1A-G9W-mut  |
| ۴۰۹۸                 | ۱/۰۱         | ۱/۸          | ۱۰                | ۰/۴           | ۵۰                      | -۲/۲۲ | ۰/۳۷       | D1H-G23A-mut |
| ۴۲۱۴                 | ۱            | ۲/۰۲         | ۱۰                | ۰/۳۱          | ۵۰                      | -۲/۳  | ۰/۳۷       | D1H-G9W-mut  |

## بخش تجربی

## سنتز و آماده سازی پپتید

پس از انتخاب بهترین پپتید بر اساس نتایج شبیه سازی (پپتید D1A-G9W) توسط شرکت امینسان ساخته شد. در نهایت ۴ میلی گرم از پپتید با درصد خلوص بالای ۷۰٪ توسط ستون کروماتوگرافی Kromasil-C18-5um تخلیص و در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی ۱۰ میلی مولار با  $\text{pH}=7/4$  حل شد تا غلظت استوک اصلی به ۸ میلی گرم بر میلی لیتر برسد. سپس از این استوک، غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد.

## سنجش خاصیت ضد میکروبی

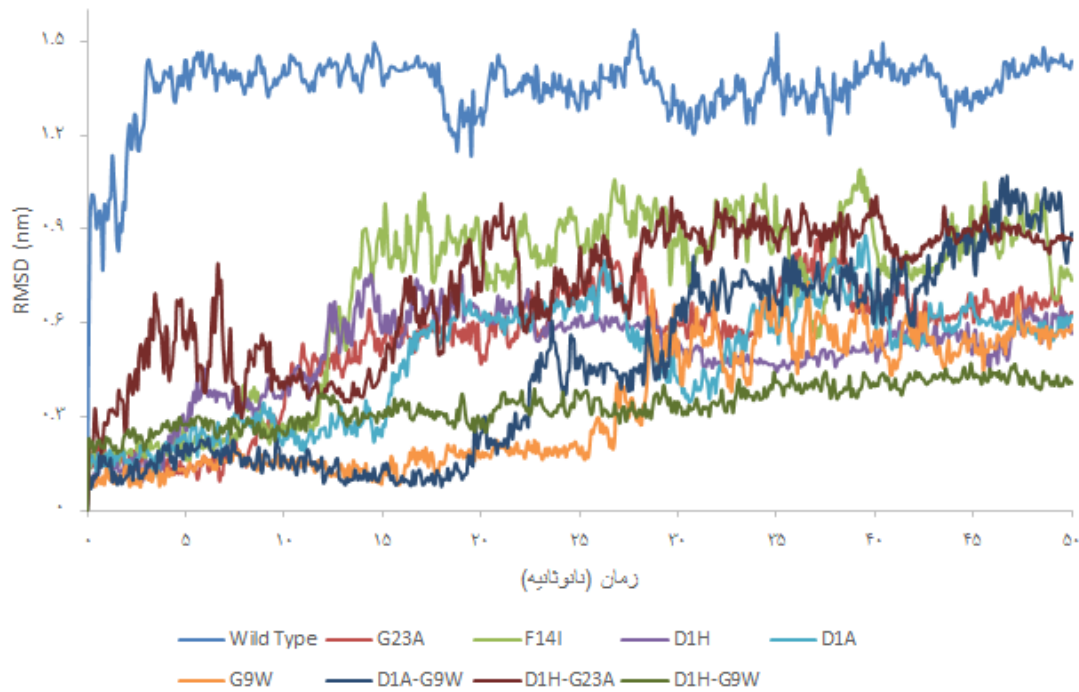
برای سنجش خاصیت ضد میکروبی پپتید وحشی و جهش یافته، آزمون میکروبی بررسی کمترین غلظت مهارکننده از طریق میکروپلیت (ریز رقت سازی) بر روی باکتری‌های گرم منفی مختلف مانند سالمونلاتیفی موریم، سراسیا مارسنس و باکتری‌های گرم مثبت مانند انتروکوکوس فکالیس و باسیلوس سوبتیلیس انجام شد. برای همه باکتری‌ها کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه آزمون شامل موارد زیر بودند. کنترل منفی: آب مقطر، کنترل مثبت: آمپی‌سیلین برای باکتری‌های گرم مثبت، کلرامفنیکل برای باکتری‌های گرم منفی نمونه آزمون: پپتید هیستاتین ۳ وحشی و جهش یافته سنتزی. غلظت استوک اولیه هر کدام از محلول‌های آزمون معادل ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. برای هر باکتری، استوک هر کدام از محلول‌های آزمون (به جز آب) در غلظت میلی گرم بر میلی لیتر ۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و سپس مراحل اجرای تست، مطابق با دستورالعمل ذکر شده در بخش قبل، انجام شد. در نهایت ۸ غلظت از محلول‌های مورد آزمون درون چاهک‌ها موجود بود که این غلظت‌ها به ترتیب کاهش عبارتند از: ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵، ۴/۶۹ و ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر. در مورد نمونه کنترل منفی، ۷۵ میکرولیتر آب مقطر با ۷۵ میکرولیتر محیط کشت میکروبی با کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند مخلوط شد (Andrews, 2001).

## نتایج

## نتایج نظری

## نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدها در آب

مقدار پارامتر جذرمیانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی نشان‌دهنده جابجایی مکانی همه اتم‌های اسکلت اصلی پپتید در طول زمان شبیه‌سازی نسبت به زمان شروع شبیه‌سازی است که هرچه نوسانات آن کمتر باشد بدین معنی است که ساختار پپتید بهتر به تعادل رسیده است. شکل ۱ نشان‌دهنده RMSD اسکلت اصلی پپتیدها نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی است. تغییرات ناچیز جذرمیانگین مربع انحرافات در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی نشان‌دهنده این است که همه اتم‌های اسکلت اصلی نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی تغییر مکان قابل توجهی نمی‌کنند و پپتیدها به تعادل ساختاری رسیده اند و زمان شبیه‌سازی کافی بوده است. بنابراین همه آنالیزها در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی انجام شد. از طرف دیگر RMSD پپتیدهای جهش یافته کمتر از پپتید وحشی می باشد به دلیل اینکه ساختار اولیه پپتیدهای جهش یافته از ایجاد جهش در ساختار نهایی پپتید وحشی بعد از شبیه‌سازی در آب بدست آمده است، بنابراین پپتیدهای جهش یافته در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی RMSD کمتری داشته اند. علت تغییرات RMSD در طول شبیه‌سازی نسبت به لحظه شروع این است که بعلاوه این که پپتیدها ساختار کریستالوگرافی نداشتند، ساختار اولیه آنها به کمک نرم افزار هایپرکم ساخته شد و تغییرات ساختار آنها در طول شبیه‌سازی پپتید، طبیعی است، هر چند در نهایت بعلاوه کوچک بودن پپتیدها، مانند پروتئین‌ها ساختار کاملاً منظمی نمی‌توانند داشته باشند.



شکل ۱- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی پپتیدها در حضور مولکولهای آب در طول زمان شبیه سازی  
Figure 1. The backbone root means square deviation of peptides during simulation time in existence of water molecules

در جدول ۲ میانگین کلیه نتایج شبیه‌سازی در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی ذکر شده است.

جدول ۲- میانگین پارامترها در ۳۰ نانوثانیه آخر ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدهای وحشی و جهش‌یافته در حضور مولکولهای آب  
Table 2. The average of parameters during the last 30 ns of 50 ns MD simulation for wild type and mutated peptides in existence of water molecules

| میانگین RMSF<br>باقیمانده<br>ها<br>(نانومتر) | میانگین سطح در<br>دسترس حلال پروتئین<br>(نانومتر مربع) | میانگین شعاع<br>چرخش (نانومتر) | RMSD اسکلت<br>اصلی (نانومتر) |                        |
|--|--|--------------------------------|------------------------------|------------------------|
| $0.47 \pm 0.11$                              | $34.44 \pm 2.32$                                       | $1.08 \pm 0.13$                | $1.36 \pm 0.06$              | پپتید وحشی             |
| $0.3 \pm 0.13$                               | $33.08 \pm 1.51$                                       | $0.99 \pm 0.03$                | $0.66 \pm 0.08$              | جهش G23A               |
| $0.52 \pm 0.17$                              | $34.66 \pm 1.75$                                       | $1.1 \pm 0.09$                 | $0.86 \pm 0.1$               | جهش F14I               |
| $0.31 \pm 0.13$                              | $32.16 \pm 1.96$                                       | $0.95 \pm 0.04$                | $0.55 \pm 0.06$              | جهش D1H                |
| $0.34 \pm 0.14$                              | $33.48 \pm 1.93$                                       | $0.98 \pm 0.03$                | $0.6 \pm 0.09$               | جهش D1A                |
| $0.3 \pm 0.13$                               | $35.07 \pm 2.07$                                       | $1.03 \pm 0.07$                | $0.46 \pm 0.16$              | جهش G9W                |
| $0.37 \pm 0.2$                               | $34.05 \pm 2.05$                                       | $1.04 \pm 0.09$                | $0.66 \pm 0.2$               | جهش ترکیبی<br>D1A-G9W  |
| $0.49 \pm 0.15$                              | $34.34 \pm 1.56$                                       | $1.08 \pm 0.09$                | $0.85 \pm 0.09$              | جهش ترکیبی<br>D1H-G23A |
| $0.15 \pm 0.05$                              | $33.17 \pm 1.42$                                       | $0.99 \pm 0.03$                | $0.37 \pm 0.04$              | جهش ترکیبی<br>D1H-G9W  |

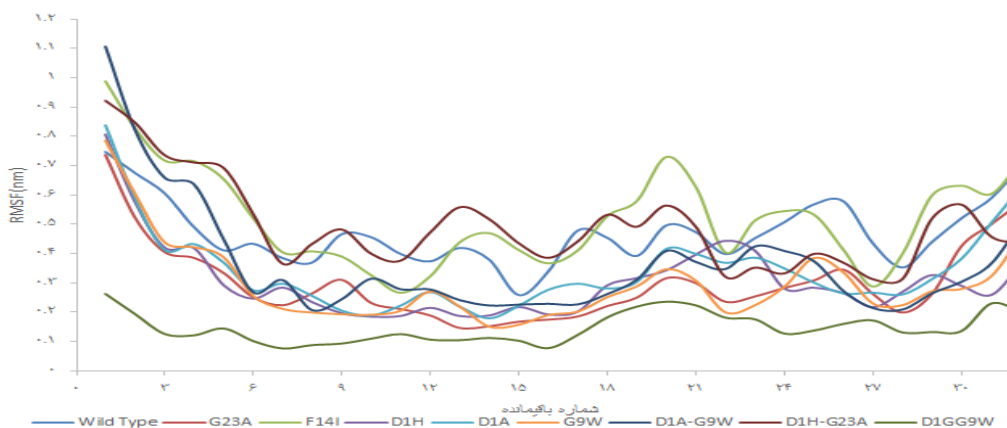
دردسترس حلال پپتیدها با شعاع چرخش آنها هماهنگ است. بعلاوه تغییرات کم سطح دردسترس حلال پپتیدها نشان‌دهنده به تعادل رسیدن ساختار پپتیدها است (جدول ۲).

مقدار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات اسکلت اصلی (RMSF) پپتیدها نشان‌دهنده جابجایی تک‌تک باقیمانده‌ها نسبت به مکان اولیه خود طی زمان شبیه‌سازی است. اگر RMSF ناحیه‌ای از پروتئین نسبت به سایر قسمت‌های آن بیشتر باشد، این ناحیه (به استثنای ناحیه ابتدا و انتهای پروتئین) لوپ است. در مورد پپتیدها به دلیل ساختار کوچک و بی‌نظمی که دارند نوسانات RMSF هم بیشتر از ساختار پروتئین‌های بزرگ است. در شکل ۲ تغییرات RMSF پپتیدها در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی نشان داده شده است. نمودار RMSF نشان می‌دهد که مقدار میانگین RMSF ساختار همه پپتیدها بجز جهش F14I و جهش ترکیبی D1H-G23A کمتر از مقدار پپتید وحشی بود (جدول ۲) که به این معنی است که انعطاف پذیری پپتیدها در اثر اغلب جهش‌ها در حضور آب غالباً کم می‌شود (شکل ۲).

همچنین مقادیر انرژی پتانسیل کل سامانه طی ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی برای پپتیدهای وحشی و جهش‌یافته بدست آمد که تغییرات ناچیز آن در طول ۳۰ نانوثانیه آخر نشان‌دهنده به تعادل رسیدن سامانه‌ها بود. بعلاوه مقادیر دما در همه سامانه‌ها محاسبه شد و در محدوده ۳۰۰ کلوین بود و تغییرات ناچیز انحراف معیار دما نشان‌دهنده به تعادل رسیدن گرمایی سامانه بود (اطلاعات نمایش داده نشده است).

نمودار شعاع چرخش ( $R_g$ )، نمایانگر شکل کلی، ساختار سوم پروتئین و فضایی که پروتئین اشغال می‌کند، است. نمودار  $R_g$  پپتیدها نشان داد که شعاع چرخش همه پپتیدها مشابه است. تغییرات کم شعاع چرخش پپتیدها نیز نشان‌دهنده به تعادل رسیدن ساختار پپتیدها می‌باشد (جدول ۲).

سطح در دسترس حلال پروتئین‌ها اهمیت ویژه‌ای در بررسی میانکنش پروتئین با آب، سایر لیگاندها و پروتئین‌های دیگر و یا ساختار خود پروتئین دارد. سطح در دسترس حلال همه پپتیدها مشابه است و این یعنی این جهش‌ها اثر چندانی روی سطح در دسترس حلال پپتیدها نگذاشته است. همچنین مقادیر سطح



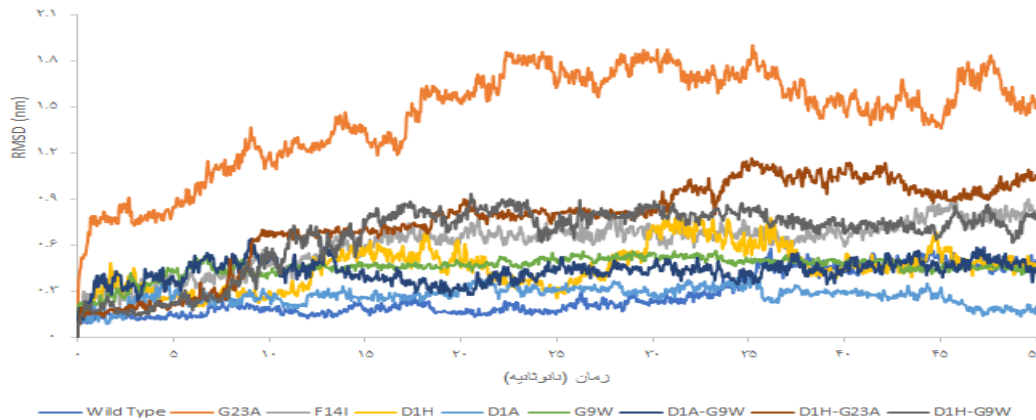
شکل ۲- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات اسکلت اصلی (RMSF) پپتیدها در حضور مولکولهای آب در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی

Figure 2. The plot of backbone root means square fluctuations (RMSF) of peptides during the last 30 ns of MD simulation in existence of water molecules

زمان شبیه‌سازی (۵۰ نانوثانیه) است. میانگین RMSD اسکلت اصلی پپتیدها در حضور میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی در جدول ۳ ذکر شده است. مقایسه مقادیر RMSD جدول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که مقدار میانگین RMSD اسکلت اصلی هر پپتید در حضور میسل SDS نسبت به مقدار معادل آن در آب کمتر است. علت این مساله هم این است که ساختار شروع برای شبیه‌سازی در حضور میسل از ساختارهای نهایی پپتیدها در آب گرفته شده است و چون قبلاً پپتیدها به تعادل رسیده بودند در حضور SDS هم تغییر جابجایی کمتری در اسکلت اصلی داشته‌اند.

### نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدها در حضور (SDS)

شکل ۳ نمایانگر RMSD اسکلت اصلی پپتیدها در حضور میسل SDS نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی است. تغییرات ناچیز جذرمیانگین مربع انحرافات در سی نانوثانیه آخر شبیه‌سازی نشان‌دهنده این است که همه اتم‌های اسکلت اصلی نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی تغییر مکان قابل توجهی نمی‌کنند و نشان‌دهنده به تعادل رسیدن ساختاری اسکلت اصلی پپتید در حضور میسل SDS و کافی بودن



شکل ۳- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) پپتیدها در حضور میسل SDS در طول زمان شبیه سازی

Figure 3. The Root means square deviation (RMSD) of peptides in existence of SDS micelle during simulation time

پپتیدها در حضور میسل SDS نسبت به حالت آب تقریباً تغییری نکرده بود ولی سطح در دسترس حلال اغلب پپتیدها در حضور میسل SDS کمی بیشتر از مقدار آنها در آب بود که احتمالاً باعث کاهش کشش سطحی آب و باز شدن ساختار پپتیدها در حضور میسل SDS بود (جدول ۳).

نمودارهای انرژی پتانسیل و دما بیانگر به تعادل رسیدن ساختاری و دمایی پپتیدها در حضور میسل SDS بود. تغییرات ناچیز شعاع چرخش و سطح در دسترس حلال پپتیدهای وحشی و جهش‌یافته در حضور میسل SDS نیز حاکی از ثابت شدن این پارامترها و به تعادل رسیدن سامانه‌ها بود. مقادیر شعاع چرخش

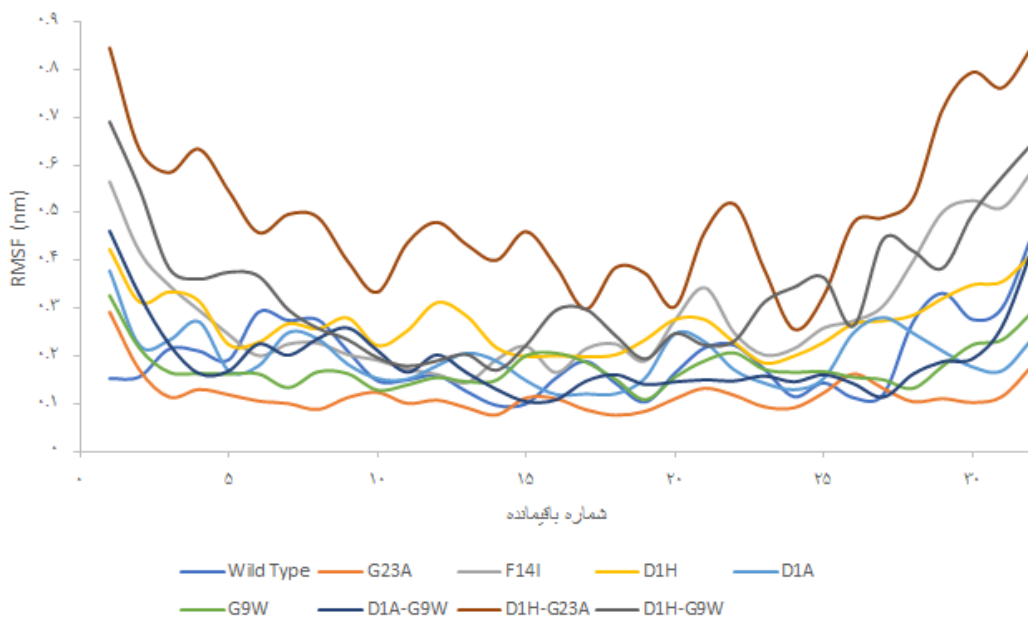
جدول ۳- میانگین پارامترهای پپتیدها در حضور میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی

Table 3. The average of parameters during the last 30 ns simulation in existence of SDS micelle.

| میانگین RMSF اسکلت اصلی (نانومتر) | تعداد تماس‌ها بین پپتید و میسل | فاصله بین مرکز جرم‌های پپتید و SDS (نانومتر) | سطح در دسترس کل پروتئین (نانومتر مربع) | شعاع چرخش (نانومتر) | RMSD اسکلت اصلی (نانومتر) |            |
|-----------------------------------|--------------------------------|--|--|---------------------|---------------------------|------------|
| ۰/۲۱ ± ۰/۰۸                       | ۴۸۰ ± ۵۲/۸                     | ۱/۶۵ ± ۰/۲۱                                  | ۳۵/۲ ± ۱/۶                             | ۱/۰۷ ± ۰/۰۷         | ۰/۳۵ ± ۰/۱۳               | پپتید وحشی |
| ۰/۲۱ ± ۰/۰۴                       | ۴۹۸/۱ ± ۳۶/۴                   | ۰/۵۷ ± ۰/۱۴                                  | ۳۲/۷ ± ۰/۹۹                            | ۰/۹۸ ± ۰/۰۳         | ۱/۶۵ ± ۱/۲                | G23A       |
| ۰/۱۲ ± ۰/۱۳                       | ۵۳۶/۷ ± ۳۸/۷                   | ۱/۳۹ ± ۰/۱۹                                  | ۳۷/۰۶ ± ۱/۱۴                           | ۱/۲۳ ± ۰/۰۳         | ۰/۷ ± ۰/۰۷                | F14I       |
| ۰/۲۹ ± ۰/۱۰۶                      | ۵۶۴/۷ ± ۴۳/۱                   | ۱/۶۲ ± ۰/۱۵                                  | ۳۸/۳۵ ± ۱/۳۶                           | ۱/۲۱ ± ۰/۰۷         | ۰/۵۱ ± ۱/۲                | D1H        |
| ۰/۲۷ ± ۰/۰۶                       | ۳۵۲/۷ ± ۶۴/۵                   | ۱/۲۷ ± ۰/۲۷                                  | ۳۲/۲۱ ± ۱/۳۶                           | ۰/۹۶ ± ۰/۰۲         | ۰/۲۹ ± ۰/۰۵               | D1A        |
| ۰/۲۱ ± ۰/۰۵                       | ۴۴۳/۲ ± ۳۸/۶                   | ۱/۹۵ ± ۰/۱۲                                  | ۳۲/۷۲ ± ۱/۰۲                           | ۰/۹۴ ± ۰/۰۱         | ۰/۴۹ ± ۰/۰۳               | G9W        |
| ۰/۱۸ ± ۰/۰۸                       | ۴۹۴ ± ۳۸/۳                     | ۱/۸۶ ± ۰/۱                                   | ۳۶/۴ ± ۱/۱                             | ۱/۱۹ ± ۰/۰۳         | ۰/۴۴ ± ۰/۰۵               | D1A-G9W    |
| ۰/۱۹ ± ۰/۱۶                       | ۵۶۸/۸ ± ۷۳/۷                   | ۱/۲۹ ± ۰/۳۲                                  | ۳۸/۶۵ ± ۱/۹۷                           | ۱/۳ ± ۱/۲           | ۰/۹۴ ± ۱/۱                | D1H-G23A   |
| ۰/۱۵ ± ۰/۱۴                       | ۶۱۸/۴ ± ۸۲/۹                   | ۱/۴۶ ± ۰/۱۸                                  | ۳۸/۰۴ ± ۱/۱                            | ۱/۳۱ ± ۰/۰۴         | ۰/۷۷ ± ۰/۰۶               | D1H-G9W    |

در آب (حالت آزاد) است که نمایانگر کاهش انعطاف پذیری ساختار پپتیدها در حضور میسل SDS نسبت به حالت آب است و با کاهش RMSD اسکلت اصلی در حضور میسل SDS هماهنگ است.

شکل ۴ نمودار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات اسکلت اصلی (RMSF) پپتید در حضور میسل SDS را نشان می‌دهد. تغییرات RMSF پپتیدها در حضور میسل SDS کمتر از این مقدار

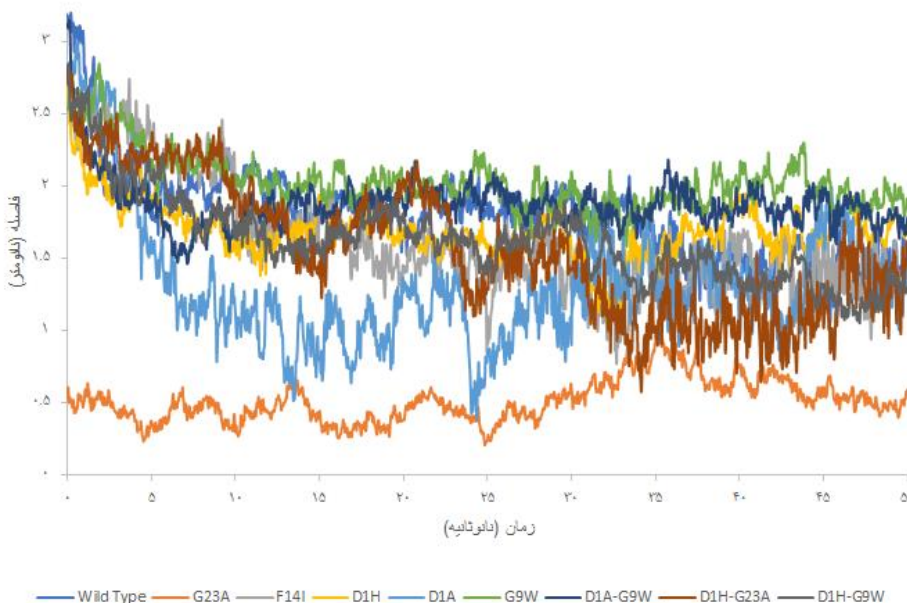


شکل ۴- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF) پپتیدها در حضور میسل SDS

Figure 4. The plot of backbone root means square fluctuations (RMSF) of peptides during the last 30 ns of MD simulation in existence of SDS micelle

فاصله کمتری از میسل SDS در طول شبیه سازی داشت. نوسان فاصله بعلت ماهیت پویای شبیه سازی است. تغییرات کم این پارامتر هم نشان دهنده پایدار شدن ساختار کمپلکس پپتید-میسل است (جدول ۳). در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی هم فاصله ثابت می شود.

نمودار تغییرات فاصله بین مرکز جرم پپتیدها و میسل SDS (شکل ۵) نشان دهنده کم شدن این فاصله در طول زمان شبیه سازی و جذب پپتیدها است. پپتیدها به دلیل دارا بودن باقیمانده های مثبت به سمت میسل SDS که دارای بار منفی است، کشیده می شوند. همانطور که از این نمودار مشخص است جهش G23A



شکل ۵- نمودار تغییرات فاصله بین مرکز جرم پپتیدها و میسل SDS در طول زمان شبیه سازی

Figure 5. The plot of variations of distance between the center of mass peptides and SDS micelle during simulation time

میانگین تعداد تماس های پپتیدها به میسل SDS هم در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی در جدول ۳ گزارش شده است. تعداد تماس های زیاد در این زمان حاکی از جذب پپتید توسط میسل SDS است. این نتایج نشان می دهد که همه پپتیدها بجز جهش

نسبت به جذب تصادفی بیشتر می‌شود. نتایج این جدول نشان می‌دهد که همه پپتیدها در فاصله کمی (بین ۱۰ تا ۱۳ انگستروم) با احتمال حدود سه برابر بیشتر از حالت تصادفی جذب میسل SDS شده‌اند. فاصله کمتر بین پپتیدها و میسل بعلت آبپوشی و مزاحمت مولکولهای آب امکان پذیر نیست. این نتایج با نمودار فاصله مرکز جرم پپتیدها تا میسل SDS هماهنگ است.

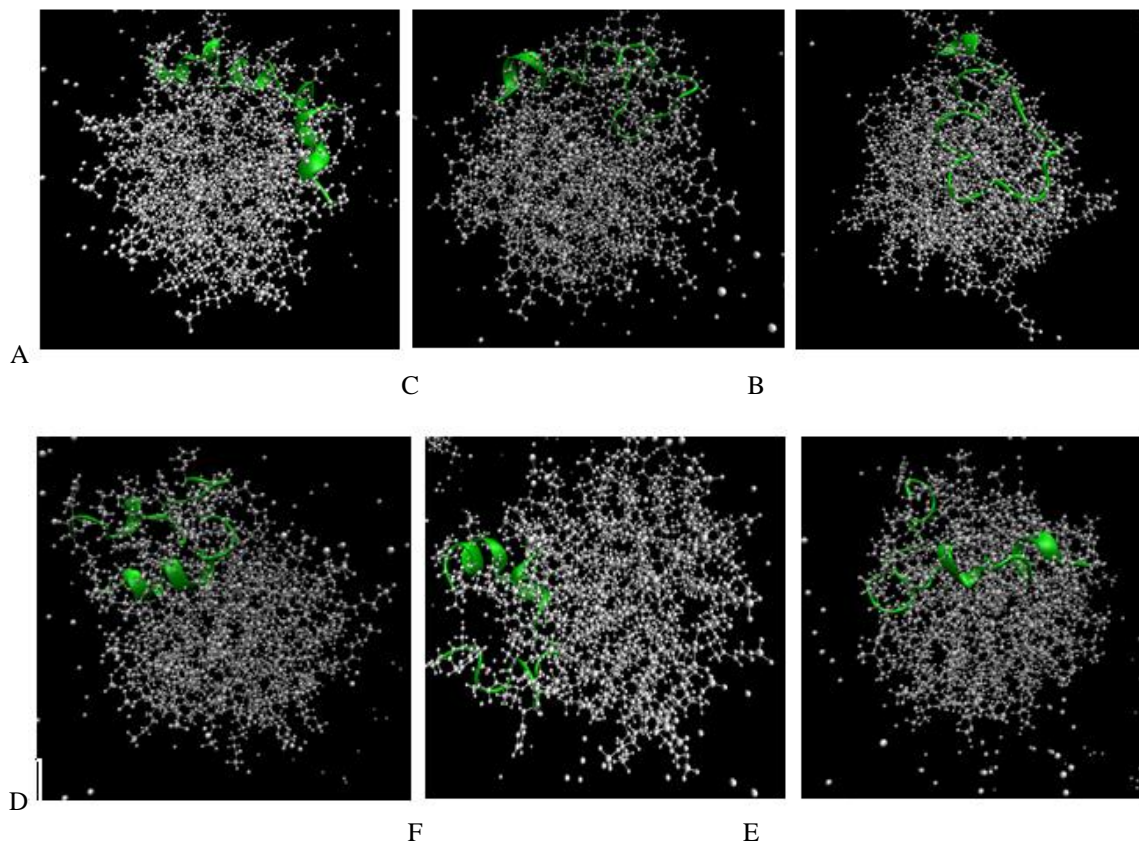
D1A و G9W تعداد تماس‌های بیشتری نسبت به پپتید وحشی داشته‌اند. همچنین تابع توزیع شعاعی که احتمال حضور پپتید نسبت به میسل SDS در فواصل مختلف را نشان می‌دهد، در ۳۰ نانوثانیه آخر بدست آمد. در جدول ۴ بیشترین احتمال قرار گرفتن پپتید نسبت به میسل و مقدار این فاصله برحسب نانومتر گزارش شده است. هر چه این احتمال از یک بزرگتر باشد، احتمال جذب

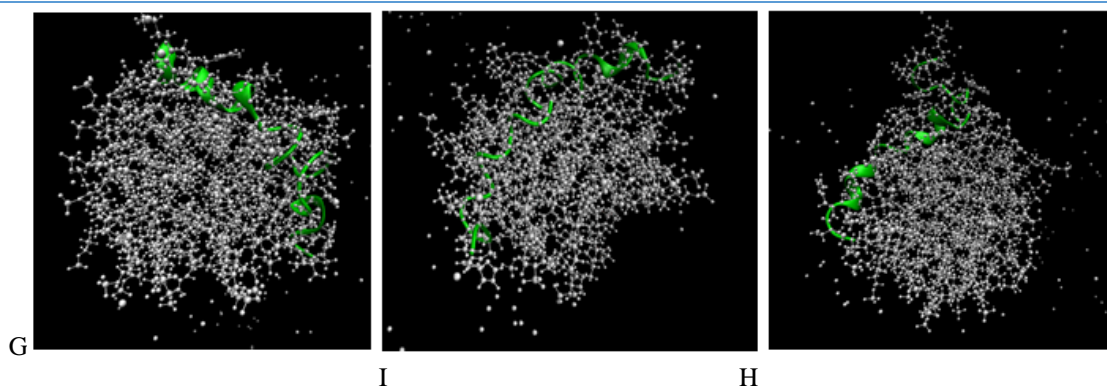
جدول ۴- فاصله ای که بیشترین احتمال حضور پپتیدها نسبت به میسل SDS رخ می‌دهد.

Table 4. The distance that the most probability existence of peptides to SDS micelle occur

| پپتید      | فاصله پپتید از میسل SDS (نانومتر) | بیشترین احتمال |
|------------|-----------------------------------|----------------|
| پپتید وحشی | ۱/۳۵۲                             | ۳/۳۴۱          |
| G23A       | ۱/۳۸۲                             | ۲/۸۵۲          |
| F14I       | ۱/۰۲                              | ۳/۰۱           |
| D1H        | ۱/۰۴۸                             | ۳/۱۵۵          |
| D1A        | ۱/۵۴                              | ۲/۲۵۱          |
| G9W        | ۱/۳۹۸                             | ۲/۴۱۶          |
| D1A-G9W    | ۱/۳۲۲                             | ۳/۲۱۷          |
| D1H-G23A   | ۱/۰۱۴                             | ۳/۱۰۴          |
| D1H-G9W    | ۱/۰۳۲                             | ۳/۶۳۳          |

در شکل ۶ ساختار نهایی پپتیدها در حضور میسل SDS پس از ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی نشان داده شده است. همان طور که از تصاویر مشخص است پپتید D1A-G9W بخوبی توسط میسل SDS جذب شده است.





شکل ۶- ساختار نهایی پپتیدها در حضور میسل SDS پس از ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی. (A) پپتید وحشی، (B) پپتید با جهش G23A، (C) پپتید با جهش F14I، (D) پپتید با جهش D1H، (E) پپتید با جهش D1A، (F) پپتید با جهش G9W، (G) پپتید با جهش ترکیبی D1A-G9W، (H) پپتید با جهش ترکیبی D1H-G23A، (I) پپتید با جهش ترکیبی D1H-G9W. پپتیدها با رنگ سبز و با فرمت New Carton و میسل با رنگ خاکستری و با فرمت میله و گلوله نشان داده شده است.

Figure 6. The final structure peptides in existence of SDS micelle after 50 ns MD simulation. A) Wild type peptide, B) G23A mutation, C) F14I mutation, D) D1H mutation, E) D1A mutation, F) G9W mutation, G) D1A-G9W mutation, H) D1H-G23A mutation, I) D1H-G9W mutation. Peptide was colored with green and New Cartoon format and micelle was colored with gray and CPK format

به منظور بررسی ساختار دوم پپتیدها در حالت آب و در حضور میسل SDS، درصد باقیمانده‌هایی که در مارپیچ آلفا یا دور (Turn) قرار دارند و درصد باقیمانده‌هایی که در پیچ تصادفی قرار دارند در طول ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی محاسبه و در جدول ۵ ذکر شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که اغلب پپتیدها در حضور میسل SDS تا حدی ساختارهای دوم منظم را نسبت به حالت عدم حضور میسل SDS از دست داده‌اند و ساختارهای بی‌نظم و کوئل افزایش پیدا کرده‌اند که این مساله بعلت کوچک بودن پپتید و کاهش کشش سطحی در حضور میسل SDS که باعث واسرشته شدن پروتئین‌ها می‌شود، طبیعی است. این مساله با افزایش سطح در دسترس حلال پپتیدها در اثر حضور میسل SDS (جدول ۳) هماهنگ است.

جدول ۵- درصد عناصر ساختار دوم پپتیدها در حضور آب و میسل SDS

Table 5. The percentage of secondary structure elements of peptides in existence of water molecules and SDS micelle

| پپتید      | مجموع درصد مارپیچ آلفا و دور در آب | مجموع درصد مارپیچ آلفا و دور در حضور میسل SDS | درصد پیچ تصادفی در آب تصادفی | درصد پیچ تصادفی در حضور SDS |
|------------|------------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|
| پپتید وحشی | ۵۹                                 | ۵۲  | ۱۵                           | ۱۹                          |
| G23A       | ۵۱                                 | ۵۱  | ۲۰                           | ۲۴                          |
| F14I       | ۴۹                                 | ۵۴  | ۱۴                           | ۱۴                          |
| D1H        | ۵۳                                 | ۴۳  | ۱۸                           | ۱۴                          |
| D1A        | ۵۲                                 | ۴۶  | ۱۹                           | ۲۱                          |
| G9W        | ۴۷                                 | ۴۷  | ۱۶                           | ۲۲                          |
| D1A-G9W    | ۵۶                                 | ۴۴  | ۱۷                           | ۱۷                          |
| D1H-G23A   | ۵۲                                 | ۶۱  | ۲۱                           | ۱۴                          |
| D1H-G9W    | ۵۴                                 | ۵۳  | ۱۶                           | ۱۹                          |

## محاسبه انرژی آزاد اتصال پپتیدها به میسل SDS

نتایجی که تاکنون ذکر شد بطور کیفی جذب پپتید توسط میسل SDS را تایید می‌کند. به منظور بررسی کمی جذب پپتید توسط میسل انرژی اتصال پپتید به میسل با روش MM/PBSA محاسبه شد (جدول ۵). در ضمن مجموع انرژی واندروالس و انرژی آبپوشی غیرقطبی و همچنین مجموع انرژی الکتروستاتیک و انرژی آبپوشی

قطبی پپتیدها در اتصال به میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی گزارش شده است. هرچه مقدار انرژی آزاد اتصال منفی‌تر باشد، اتصال پپتید به میسل قوی‌تر بوده و می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً پپتید خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری دارد. جدول ۶ میانگین انرژی آزاد اتصال بدست آمده در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی پپتیدها به میسل SDS را نشان می‌دهد.

جدول ۶- نتایج انرژی آزاد اتصال MM/PBSA پپتیدها با میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی

**Table 6.** The results of MM/PBSA binding free energy of peptides with SDS micelle during the last 30 ns of MD simulation

| انرژی اتصال (کیلوژول برمول) | مجموع انرژی الکتروستاتیک و انرژی آبپوشی قطبی (کیلوژول برمول) | مجموع انرژی واندروالس و انرژی آبپوشی غیرقطبی (کیلوژول برمول) |            |
|-----------------------------|--|--|------------|
| -۲۵۶۹۷/۳ ± ۲۹/۵             | -۲۵۰۷۷/۳   | -۶۲۵/۴   | D1A-G9W    |
| -۲۴۸۷۹/۱ ± ۳۷/۳             | -۲۴۱۷۰/۳   | -۷۰۵/۸   | D1H-G23A   |
| -۲۴۶۷۵/۸ ± ۲۹/۵             | -۲۲۹۸۹/۶   | -۶۸۸/۲   | D1H        |
| -۲۳۳۱۹/۴ ± ۷۴/۳             | -۲۲۶۱۳/۴   | -۷۲۰/۹   | D1H-G9W    |
| -۲۲۱۴۴/۹ ± ۳۲/۳             | -۲۱۷۴۱   | -۴۰۳/۹   | D1A        |
| -۲۱۱۶۱/۵ ± ۲۷/۲             | -۲۰۶۵۲/۸   | -۵۰۹/۸   | G9W        |
| -۲۱۰۹۴/۱ ± ۲۷/۲             | -۲۰۵۱۱/۳   | -۵۸۲/۶   | پپتید وحشی |
| -۱۹۶۷۲/۴ ± ۲۷/۶             | -۱۹۰۲۱/۱   | -۶۵۱/۳   | F14I       |
| -۱۸۵۰۷/۱ ± ۱۹/۸             | -۱۷۹۲۱/۲   | -۵۸۶/۱   | G23A       |

انرژی آبپوشی گروه های قطبی بین پپتیدها و میسل از مجموع سهم انرژی واندروالس و انرژی آبپوشی گروههای غیرقطبی بین پپتیدها و میسل بیشتر و مهم تر بوده است. بعبارت دیگر نیروی غالب در میانگین پپتیدها با میسل SDS نیروی الکتروستاتیک بوده است که با توجه به منفی بودن بار سطح میسل و مثبت بودن بار پپتیدها منطقی است. در اتصال جهش D1A-G9W به میسل SDS باقیمانده های آرژنین ۱۲ و آلانین ۱ و لیزین ۱۱ و لیزین ۵ و آرژنین ۶ و آرژنین ۲۲ و لیزین ۱۳ و لیزین ۱۷ و آرژنین ۲۵ به ترتیب بیشترین نقش و مناسبترین انرژی اتصال به میسل SDS را داشتند. نقش زیاد این باقیمانده ها بعلاوه بار مثبت آنها منطقی می باشد. البته جهش های D1H-G23A و D1H با اختلاف نزدیکی نسبت به جهش D1A-G9W قرار دارند. زیرا این جهش ها بار منفی پپتید را که مانع جذب آن می شود را کاهش داده اند. بنابراین این جهش ها نیز می تواند گزینه های مناسبی برای انجام آزمایشات تجربی باشد.

نتایج جدول ۶ نشان می دهد همه پپتیدها توانایی اتصال به میسل را دارند و انرژی اتصال همگی منفی بوده است. البته انرژی اتصال جهش های G23A و F14I مثبت تر از پپتید وحشی است و این نشان می دهد این جهش ها باعث کم شدن قدرت اتصال پپتیدها به میسل می شوند ولی قدرت اتصال در بقیه جهش ها به ویژه جهش ترکیبی D1A-G9W از پپتید وحشی بیشتر شده است. ترتیب انرژی آزاد اتصال پپتیدها به این صورت خواهد شد:

$$D1A-G9W < D1H-G23A < D1H < D1H-G9W < D1A < G9W < \text{پپتید وحشی} < F14I < G23A$$

بنابراین جهش های ترکیبی غالباً بهتر متصل شده اند و جهش ترکیبی D1A-G9W دارای کمترین انرژی اتصال است و انرژی اتصال آن نسبت به پپتید وحشی حدود ۲۰ درصد کاهش پیدا کرده است. بنابراین می توان نتیجه گرفت این جهش احتمالاً حدود ۲۰ درصد قدرت ضد میکروبی بیشتری نسبت به پپتید هیستاتین ۳ وحشی دارد. مجموع سهم انرژی الکتروستاتیک و

## نتایج تجربی

## سنجش خاصیت ضد میکروبی

MIC برای باکتری انتروکوکوس فکالیس  $37/5 \mu\text{g/ml}$ ، برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس  $75 \mu\text{g/ml}$  بدست آمد میزان MIC با پپتید وحشی بر روی این دو باکتری بیشتر از  $300 \mu\text{g/ml}$  بود. مقادیر MIC پپتید وحشی و جهش یافته D1A-G9W برای باکتری های گرم منفی اختلافی را نشان نداد. نتایج نشان دهنده تاثیر آنتی باکتریال این پپتید بر روی طیفی از باکتری های پاتوژن گرم مثبت می باشد.

به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی پپتید وحشی و جهش D1A-G9W ساخته شده آزمون MIC به روش ریز رقت سازی انجام شد (جدول ۷). نتایج حاصل از سنجش MIC نشان داد که مقدار

جدول ۷ - نتایج مربوط به سنجش MIC به روش ریز رقت سازی مربوط به پپتید وحشی و پپتید D1A-G9W

Table 7. Results related to MIC measurement by microdilution method related to wild type and D1A-G9W mutant peptides

| MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) | ۸ | ۷ | ۶ | ۵ | ۴ | ۳ | ۲ | ۱ | آزمون                 | باکتری              |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------------------|---------------------|
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | پپتید جهش یافته       | سالمونلا تیفی موریم |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | پپتید وحشی            | سالمونلا تیفی موریم |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | کنترل منفی آب         | سالمونلا تیفی موریم |
| ۳۰۰                      | + | + | + | + | + | + | + | - | کنترل مثبت کلرامفنیکل | سالمونلا تیفی موریم |
| ۳۷/۵                     | + | + | + | + | - | - | - | - | پپتید جهش یافته       | انتروکوکوس فکالیس   |
| ۳۰۰                      | + | + | + | + | + | + | + | - | پپتید وحشی            | انتروکوکوس فکالیس   |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | کنترل منفی آب         | انتروکوکوس فکالیس   |
| <۲/۳۴                    | - | - | - | - | - | - | - | - | کنترل مثبت آمپی سیلین | انتروکوکوس فکالیس   |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | پپتید جهش یافته       | سراشیا مارسسنس      |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | پپتید وحشی            | سراشیا مارسسنس      |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | کنترل منفی آب         | سراشیا مارسسنس      |
| ۱۵۰                      | + | + | + | + | + | + | - | - | کنترل مثبت کلرامفنیکل | سراشیا مارسسنس      |
| ۷۵                       | + | + | + | + | + | - | - | - | پپتید جهش یافته       | باسیلوس سوبتیلیس    |
| ۳۰۰                      | + | + | + | + | + | + | + | - | پپتید وحشی            | باسیلوس سوبتیلیس    |
| /                        | + | + | + | + | + | + | + | + | کنترل منفی آب         | باسیلوس سوبتیلیس    |
| <۲/۳۴                    | - | - | - | - | - | - | - | - | کنترل مثبت آمپی سیلین | باسیلوس سوبتیلیس    |

+ نشان دهنده رشد باکتری

- نشان دهنده عدم رشد باکتری

اعداد ۱ تا ۸ نشان دهنده غلظت پپتیدها به ترتیب عبارتند از: ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵، ۴/۶۹ و ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر

## بحث

در این مطالعه ابتدا پپتید هیستاتین ۳ وحشی در حضور آب و در مجاورت میسل SDS به عنوان مدل ساده ای از غشا باکتری بطور جداگانه به مدت ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی شد. نمودارهای تغییرات انرژی پتانسیل کل سامانه، دما، RMSD و شعاع چرخش پپتید طی زمان شبیه سازی، صاف شدن این نمودارها و در نتیجه به تعادل رسیدن سامانه ها به خصوص در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی ها و کافی بودن زمان شبیه سازی را نشان داد. بنابراین همه آنالیزها در ۳۰ نانوثانیه آخر انجام شد. سپس بر اساس پیشنهادات مقالات هشت جهش G23A و F14I و D1H و D1A-G9W و D1H-G23A و G9W و D1H-G9W در

بررسی خصوصیات پپتیدهای ضد میکروبی یکی از حوزه های مورد توجه بیوانفورماتیک بوده تا با استفاده از آن به کشف سازوکار عملکرد و گسترش روش هایی برای کاربردهای زیست فناوری آنها بپردازند (Butu & Butu, 2011). تاکنون گزارشی مبنی بر شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتید هیستاتین ۳ یا جهش های آن ارائه نشده است.



## تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

که راهگشای بحران آینده نزدیک بشریت در زمینه مقاومت آنتی بیوتیکی در همه گیری های عفونی است. این نتایج همچنین نشان می دهد در طراحی جهش به منظور افزایش خاصیت ضدباکتری پپتیدها باید بطور همزمان روی کاهش بار منفی پپتید و افزایش خاصیت هیدروفوبیسیته آن تمرکز کرد.

## REFERENCES

- Andrews, J.M.** 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48:5-16.
- Akula, S. Welinder, C. Fu, Z. Olsson, A.K. Hellman, L.** 2023. Identification of the Major Protein Components of Human and Cow Saliva. *International journal of Molecular Science* 28;24 (23):16838.
- Butu, M. & Butu, A.** 2011. Molecular Dynamics Simulation of The Human Alpha-Defensin 5. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures* 6:907-914.
- Chen, Y. Mant, C.T. Farmer, S.W. Hancock, R.E. Vasil, M.L. & Hodges, R.S.** 2005. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry* 280:12316-29.
- Crusca, J. E. Câmara, A.S. Matos, C.O. Marchetto, R. Cilli, E.M. Lião, L.M & et al.** 2017. NMR structures and molecular dynamics simulation of hylin-al peptide analogs interacting with micelles. *Journal of Peptide Science* 23:421-30.
- 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.
- Friedrich, C.L. Moyles, D. Beveridge, T.J. Hancock, R.E.** 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44:2086-92.
- Golshani, S. Vatanara, A. Balalaie, S. Kadkhoda, Z. Abdollahi, M. Amin, M.** 2023. Development of a Novel Histatin-5 Mucoadhesive Gel for the Treatment of Oral Mucositis: In Vitro Characterization and In Vivo Evaluation. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 28;24(7):177.
- Hajishengallis, G. Russell, M.W.** 2015. *Innate Humoral Defense Factors. Mucosal Immunology (Fourth Edition)*
- Humphrey, W. Dalke, A. Schulten, K.** 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14:33-8.
- Karimi, N. Saffar, B. Ghaedi, K. Mobini Dehkordi, M.** 2014. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Genetics in the Third Millennium* 11:3306-3317. (In Persian).
- Karplus, M. McCammon, J.A.** 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology* 9:646-52
- Khurshid, Z. Naseem, M. Sheikh, Z. Najeeb, S. Shahab, S. & Zafar, M.S.** 2016. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24:515-24.
- Kia, A. & Darve, E.** 2013. The accuracy of the CHARMM22/CMAP and AMBER ff99SB force fields for modelling the antimicrobial peptide cecropin P1. *Molecular Simulation* 39:922-36.
- Kim, H. Jang, J.H. Kim, S.C. & Cho, J.H.** 2013. De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69:121-32.
- Kubo, S. Amai, K. Tanaka, J. Niimi, H.** 2023. One-tube, two-step isothermal amplification of histatin 3 mRNA for saliva screening. *Forensic Science International*. 352:111847. |
- Kumari, R. Kumar, R. & Lynn, A.** 2014. Open Source Drug Discovery Consortium. g\_mmpbsa, A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal*

of Chemical Information and Modeling 54:1951–1962.

**Langham, A. & Kaznessis, Y.N.** 2010. Molecular simulations of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols*.

**Oyama, L.B. Crochet, J.A. Edwards. J.E., Girdwood, S.E. Cookson, A.R. Fernandez-Fuentes, N. & et al.** 2017. Buwchitin: A Ruminal Peptide with Antimicrobial Potential against *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in chemistry* 5:51-63.

**Pasupuleti, M. Schmidtchen, A. & Malmsten, M.** 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology* 32:143-71

**Sayyed-Ahmad, A. Khandelia, H. & Kaznessis, Y.N.** 2009. Relative free energy of binding between antimicrobial peptides and SDS or DPC micelles. *Molecular simulation* 35:986-997.

**Seo, M.D. Won, H.S. Kim, J.H. Mishig-Ochir, T. & Lee, B.J.** 2012. Antimicrobial

peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules* 17:12276-86.

**Skog, A.E. Corucci, G. Tully, M.D. Fragneto, G. Gerelli, Y. Skepö, M.** 2023. Interaction of a Histidine-Rich Antimicrobial Saliva Peptide with Model Cell Membranes: The Role of Histidines. *Langmuir Journal* 6;39 (22):7694-7706 .

**Tavakoli, Z. Saffar, B. Mahnam, K. & Hemati R.** 2022. Design, Cloning, expression and purification of mutated Histatin3 and investigation of its antimicrobial effects. *Iranian Journal of Biology* 35:75-88. (In Persian).

**Wang, G. Mishra, B. Lau, K. Lushnikova, T. Golla, R. & Wang, X.** 2015. Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals* 8:123-50

**Welling, M.M. Brouwer, C.P. van't Hof, W. Veerman, E.C. & Amerongen, A.V.** 2007. Histatin-derived monomeric and dimeric synthetic peptides show strong bactericidal activity towards multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 51:3416-3419

\*\*\*\*\*

#### How to cite this article:

**Tavakoli, Z. Saffar, B. Mahnam, K. Hemati, R.** 2024. Theoretical and Experimental Investigation of New Mutations in Histatin 3 Peptide to Increase its Antimicrobial Property. *Nova Biologica Reperta* 11: 44-60. (In Persian).

توکلی، ز. صفار، ب. مهنام، ک. همتی، ۱۴۰۳. بررسی نظری و تجربی جهش‌های جدید در پپتید هیستاتین ۳ به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی آن.

یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۱: ۴۴-۶۰.