مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۱۱، شماره ۳، صفحات ۴۴ الی ۶۰ (۱۴۰۳)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
Nova Biologica Reperta 11(3): 44-60 (2024)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI:

# بررسی نظری و تجربی جهش های جدید در پپتید هیستاتین۳ به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی آن

**زهرا توکلی[۱]، بهناز صفار[۲و۳]، کریم مهنام*[۲و۴]، روح اله همتی [۲و۴]**

[۱] کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲] پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۳] گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۴] گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

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

**چکیده.** یکی از بحران های آینده نزدیک بشریت همه گیری بیماری های عفونی بعلت مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها است. پپتیدهای خانواده هیستاتین دارای خصوصیت ضدمیکروبی علیه سویه‌های مقاوم به دارو و التیام زخم می باشند. هدف از این پژوهش طراحی یک جهش برای افزایش خاصیت ضد باکتری پپتید هیستاتین ۳ بود. در این پژوهش، ابتدا پپتید هیستاتین۳ توسط برنامه گرومکس ۵ به مدت ۵۰ نانوثانیه در حضور آب و یون ها و همچنین در حضور میسل SDS به عنوان مدل غشا باکتری شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. سپس به منظور افزایش خاصیت ضد باکتری هیستاتین۳، هشت جهش مختلف در این پپتید طراحی و ساختارآنها تهیه شد و هرکدام با همان شرایط قبل بطور جداگانه شبیه سازی دینامیک مولکولی شدند و انرژی آزاد اتصال پپتیدها با میسل SDS با روش MM/PBSA محاسبه شد. در نهایت ۹۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی در شرایط ذکر شده نشان داد که جهش ترکیبی D1A-G9W دارای منفی‌ترین انرژی آزاد اتصال به میسل SDS است که نشاندهنده میانکنش بهتر این جهش با غشا باکتری است. نتایج بررسی های آزمون‌های میکروبی MIC این جهش برروی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، نشان از افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن برروی باکتری های گرم مثبت داشت. نتایج این پژوهش نشان می دهد برای طراحی جهش به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی پپتیدها هردوی کاهش بارمنفی پپتید و افزایش خاصیت هیدروفوبیستی باید در نظر گرفته شود.

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

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

Zahra Tavakoli[1], Behnaz Saffar[2, 3], Karim Mahnam[*2, 4], Rohollah Hemati[2, 4]

[1] MSc degree of microbial biotechnology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, [2]Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, [3]Department of Genetics, Faculty of science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran,[4]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 D1A-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: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳/ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰/ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰/ انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

## مقدمه

استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها در سطح دنیا باعث مقاومت بسیاری از باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های 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). یکی از روش ها برای جلوگیری از مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی است زیرا این پپتیدها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی مرسوم، کمتر مستعد القای مقاومت هستند، این پپتیدها به‌طور همزمان می توانند روی چندین هدف اثر بگذارند (Pasupuleti et al., 2012; Karimi et al., 2014).

هیستاتین ها پپتید های منحصر به فرد کاتیونیک، غنی از هیستیدین و متعلق به خانواده ای از پپتیدهای بزاقی انسان هستند که توسط غدد بناگوشی، زیرفکی و زیر زبانی ترشح می شوند و قدرت ضد باکتریایی، ضدقارچی و التیام زخم دارند. علاوه بر آن هیستاتین ها به عنوان مهارکننده های آنزیم های پروتئازی و کلاژنازی در درمان بیماری های گوارشی، دهان و دندان کاربرد دارند. اخیرا تحقیقات صورت گرفته نشان می دهند که هیستاتین ها به هنگام ایجاد زخم به عنوان فاکتور هایی عمل کرده که موجب فراخوانی سلول ها و عوامل التیام زخم می شوند. اساس طبقه بندی آن ها بر مبنای وزن مولکولی است. هیستاتین های ۱، ۳و۵ به ترتیب دارای ۳۳، ۳۲ و ۲۴ اسید آمینه هستند. در میان هیستاتین ها، خصوصیات هیستاتین ۳ و ۵ از نظر خواص ضد میکروبی قوی قابل ملاحظه می باشد. ساختار آن ها به گونه ای است که از یک ساختار مارپیچی در محیطی آبگریز تشکیل یافته اند که در میان آن ها هیستاتین ۵ قوی ترین پپتید و هیستاتین ۱ ضعیف ترین پپتید می باشد. این توانایی به علت ماهیت بازی یا بار مثبت این پپتید ها می باشد. به نوعی که هیستاتین ۵ دارای بیشترین باربار مثبت است و در ایجاد اختلال در غشای باکتری ها قوی ترین عملکرد را دارد. از طرفی خاصیت کلیدی دوم هیستاتین ها القای التیام زخم می باشد. خصوصیت التیام زخم هیستاتین‌ها توسط انتهای کربوکسیلی این پپتیدها اعمال می‌شود که بویژه در هیستاتین ۱و ۳ دیده می‌شود. لذا با توجه به خصوصیت دوگانه هیستاتین ۳ نقش موثر و قوی در فعالیت ضد میکروبی و نیز خاصیت التیام زخم، آن را نامزد مناسبی برای مطالعات بیشتر جهت تولید یک پپتید درمانی با خواص چند گانه می کند( Akula et al., 2023; Golshani et al., 2023; Kubo et al., 2023).

هیستاتین‌ها (Khurshid et al., 2016; Welling et al., 2007). فعالیت های مهاری و ضد میکروبی را علیه انواع مختلفی از باکتری های گرم مثبت ،گرم منفی و قارچ ها نشان داده‌اند. تحقیقات حاکی از آن است که این پپتیدها در برابر استرپتوکوکوس موتانس، پورفیرومونواس ژنژیوالیس، اکتینوباسیلوس اکتینومایستم کومیتانس ، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا مؤثر هستند. این پپتیدها 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 ماکروملکول‌های زیستی است. شبیه سازی‌ها جزئیاتی را درباره حرکات اتم های یک مولکول در زمان‌های مختلف ارائه می‌کند. غالباً انجام آزمایشات برروی ملکول واقعی دشوار است، بنابراین شبیه سازی با دادن اطلاعاتی درمورد مدل ملکولی، آسان‌تر از آزمایش تجربی است و باعث صرفه جویی در منابع مالی و زمان می شود. اگرچه پارامترهایی که در شبیه‌سازی استفاده می‌شوند تقریبی بوده اما تحت کنترل کاربر و قابل تنظیم هستند البته آزمایشات تجربی نقشی اساسی در تائید روش های شبیه‌سازی ایفا می‌کنند (Karplus &McCammon, 2002). هدف از شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتیدهای ضدمیکروبی، یافتن روشی است که پپتید مورد نظر باکتری را نابود می‌کند و همچنین گسترش مدل های قابل پیش‌بینی است که می‌توانند برای طراحی پپتیدهای ضدمیکروبی بالقوه و غیرسمی استفاده شوند (Langham & Kaznessis, 2010).

یکی از راههای بررسی عملکرد پپتیدهای ضدمیکروبی شبیه سازی آنها در حضور آب و میسل ها بعنوان مدل غشا است. شبیه سازی در میسل به دلیل اندازه کوچکتر و زمان استراحت کمتر میسل نسبت به دولایه لیپیدی (حدود ۱۰۰۰-۵۰۰ پیکوثانیه برای میسل و ده ها 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 دسیل 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، درنظر گرفته می‌شوند. میسل‌های SDS مدلی برای غشای باکتری‌ها می باشند زیرا دارای سطح خارجی آنیونی و سطح داخلی هیدروفوب هستند. تفاوت در رفتار پپتیدها در مقابل میسل SDS و میسل DPC

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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

شواهد به دست آمده نشان می دهد که هیستاتین ها 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 باکتری ها شده و از این طریق خاصیت ضد میکروبی خود را نشان می دهند. با ایجاد جهش در پپتید مورد نظر به نحوی که کاهش همزمان بار منفی پپتید و افزایش هیدروفوبیسیتی رخ دهد می تواند 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 ضدمیکروبی 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 می باشد.

## مواد و روش‌ها

بخش نظری

ساختار سه بعدی پپتید هیستاتین ۳ (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN) 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) و همچنین سرور Jpred4 (http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4) ساختار دوم پپتید هیستاتین۳ تعیین شد، نتایج نشان داد که این پپتید عمدتا به فرم پیچه تصادفی بوده و فقط در موقعیت باقیمانده های ۱۶-۱۲ به صورت مارپیچ آلفا درمی آید. بنابراین برای تهیه ساختار پپتید با برنامه هایپرکم ۸ این نکته رعایت شد. سپس ساختار رسم شده با الگوریتم کاهش پر شیب با شیب ۰/۱ کیلوکالری برانگستروم مول کمینه شد و ساختار با فرمت PDB ذخیره و با برنامه دیسکاوری استودیو (Accelrys, San Diego, CA, US) بررسی شد.

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

ساختار PDB پپتید که با برنامه هایپرکم۸ ساخته شده بود، به‌عنوان پرونده ورودی برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی درنظر 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 برروی پپتید ضدمیکروبی سکروپین، نشان دادند که میدان نیروی چارم ۲۷نتایج 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 باقیمانده هایی با بار مثبت است. به منظور ایجاد قدرت یونی ۱۴۰میلی مولار و خنثی کردن بارکل 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. درمرحله نهایی یا مرحله تولید شبیه سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NPTبه 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 ۱۹هزار مولکول آب و ۱۵۰ یون منیزیم و ۱۵۰ یون کلر شبیه سازی شد. میسل SDSبار e۶۰- دارد. سپس ساختارنهایی 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 شبیه‌سازی 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 جهش هایی که منجر به تقویت خاصیت ضدمیکروبی پپتید هیستاتین ۳ وحشی (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN) می شود، استفاده شد و هشت جهش به شرح زیر تهیه شد :

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



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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

۲. (تبدیل فنیل آلانین ۱۴به ایزولوسین (F14I) (DSHAKRHHGYKRKIHEKHHSHRGYRSNYLYDN): باقیمانده ها با زنجیره جانبی آلیفاتیک بلند مانند والین، لوسین، ایزولوسین و گلوتامین می توانند منجر به افزایش خاصیت هیدروفوبی و ضدمیکروبی شوند. همچنین تغییر باقیمانده های جایگاه‌های وسط وجوه هیدروفوبی و هیدروفیلی می تواند منجربه افزایش خاصیت دوگانه دوستی شود (Kim et al., 2013).

۳. (تبدیل آسپارتات ۱ به هیستیدین (D1H) (HSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN): کروسکا و همکاران برای پپتید ضدمیکروبی هایلین (Hylin-a1) سه آنالوگ شبیه‌سازی کردند که هر سه در انتهای آمین-N (terminalتغییر داده شدند. به انتهای آمین آن‌ها به ترتیب گروه استیل (گروه خنثی)، لیزین (بار مثبت) و آسپارتات (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 ضدمیکروبی را نشان می‌دهد و پس از آن پپتیدمشابهی که دارای گروه استیل بود خاصیت ضدمیکروبی قوی‌تری را نشان می‌دهد(Crusca et al.,2017) ، بنابراین آسپارتات ۱ در انتهای پپتید هیستاتین ۳ که دارای بار منفی است به هیستیدین تغییر یافت.

۴. (تبدیل آسپارتات ۱ به آلانین (D1A) (ASHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN): مطالعه کروسکا و همکاران نشان داد تغییر آسپارتات انتهای آمین به آلانین می تواند فعالیت ضدمیکروبی پپتید را زیاد کند(Crusca et al.,2017).

۵. (تبدیل گلیسین ۹ به تریپتوفان(G9W)(DSHAKRHHWYKRKFHEKHHSHRG YRSNYLYDN):باقیمانده تریپتوفان، به‌واسطه برهمکنش با ناحیه سطحی غشای سلول، اتصال پپتید به سطح دولایه را تسهیل می‌کند و فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت را افزایش می‌دهد .(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 جهش های ترکیبی هرکدام حاوی دو جهش بودند. اولین جهش ترکیبی، تبدیل آسپارتات ۱ به آلانین و گلیسین ۹ به تریپتوفان (D1A-G9W) (ASHAKRHHWYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN) و دومین جهش ترکیبی، تبدیل آسپارتات ۱ به هیستیدین و گلیسین ۲۳ به آلانین (D1H-G23A) (HSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRAYRSNYLYDN) و سومین جهش ترکیبی، تبدیل آسپارتات ۱ به هیستیدین و گلیسین ۹ به تریپتوفان (D1H-G9W) (HSHAKRHHWYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN) بود. بنابراین در مجموع ۸ جهش تهیه شد وهم به تنهایی و هم در حضور آب و میسل SDS بطور جداگانه شبیه سازی شدند. برای تهیه جهش ها از ساختار نهایی ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی پپتید وحشی در آب استفاده شدند. تعداد مولکولهای آب و یون ها هم در کمپلکس پپتیدهای جهش یافته و میسل SDS مشابه کمپلکس پپتید وحشی بود.

پس از اتمام شبیه سازی پپتیدها در حضور میسلSDS ، فاصله مرکز جرم پپتیدها تا مرکز جرم میسل در طول شبیه سازی و ... محاسبه شد. همچنین انرژی اتصال پپتیدها به میسل SDS از بوسیله اسکریپتg_mmpbsa (Kumari et al., 2014) محاسبه شد. همچنین سهم انرژی تک‌تک باقیمانده ها دراتصال به میسل SDSمشخص شد(Sayyed-Ahmad etal., 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 هیدروفوبیسیتی آنها دارد. بنابراین این خواص برای پپتیدهای مطالعه شده در این تحقیق توسط چند سرور بیوانفورماتیکی محاسبه شد (جدول ۱).

سمیت پپتید ها و وزن مولکولی و بار الکتریکی آنها بوسیله وبگاه toxinpred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred) تعیین شد. هیچکدام از پپتیدها خاصیت سمی نداشتند و همگی توسط این سرور بعنوان پپتیدهای غیرسمی تشخیص داده شدند.

خاصیت هومولیتیکی 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 پپتید ها توسط سرور (http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl)بررسی شد. خاصیت آنتی ژنیسیتی همه پپتیدها تقریبا برابر بود و هیچکدام از پپتیدها حاوی باقیمانده های آنتی ژن نبودند.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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.

پارامترGRAVY 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 میسیل 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) محاسبه شد. این خاصیت یک خاصیت مهم در پپتیدهای ضد باکتری است و از هیدروفوبیسیتی 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 جدول۱ انتخاب مناسب جهشها را تایید می کند و در مرحله بعد بایستی مشخص شود کدام یک از این جهش ها میانکنش مناسبت تری با میسل SDS دارند.

**جدول ۱**- خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدهای مطالعه شده در این تحقیق

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

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



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

## 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 میلی‌گرم از پپتید با درصد خلوص بالای ۷۰٪ توسط ستون کروماتوگرافی Kromasil-C18-5um تخلیص و در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۴ 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 ضدمیکروبی

برای سنجش خاصیت ضدمیکروبی پپتید وحشی و جهش یافته، آزمون میکروبی بررسی کمترین غلظت مهارکننده از طریق میکروپلیت (ریز رقت سازی) بر روی باکتری‌های گرم منفی مختلف مانند سالمونلاتیفی‌موریم، سراشیا مارسسنس 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 هیستاتین۳ وحشی و جهش‌یافته سنتزی. غلظت استوک اولیه هرکدام از محلول‌های آزمون معادل ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. برای هر باکتری، استوک هرکدام 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 به‌ترتیب کاهش عبارتند از: ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵، ۴/۶۹ و ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر. درمورد نمونه کنترل منفی، ۷۵ میکرولیتر آب مقطر با ۷۵ میکرولیتر محیط کشت میکروبی با کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند مخلوط شد(Andrews, 2001).

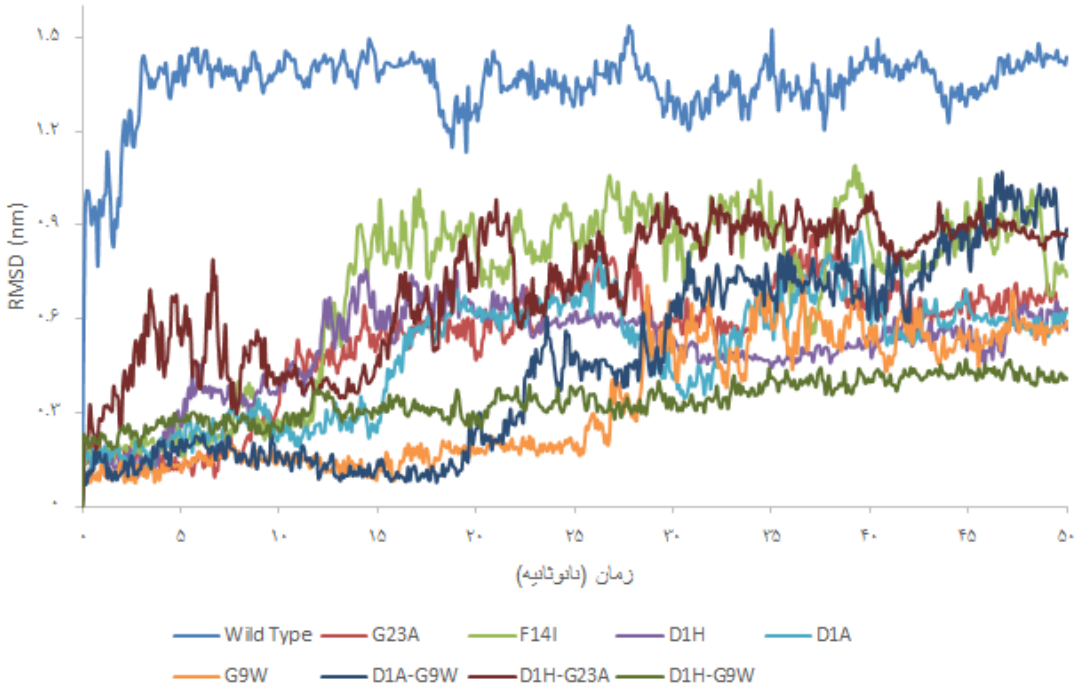
## نتایج

### 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 درطول زمان شبیه‌سازی نسبت به زمان شروع شبیه‌سازی است که هرچه نوسانات آن کمتر باشد بدین معنی است که ساختار پپتید بهتر به‌تعادل رسیده است. شکل۱ نشان‌دهنده RMSD اسکلت اصلی پپتیدها نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی درطول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی است. تغییرات ناچیز جذرمیانگین مربع انحرافات در۳۰ 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 شبیه سازی انجام شد. از طرف دیگر RMSD پپتیدهای جهش یافته کمتر از پپتید وحشی می باشد به دلیل اینکه ساختار اولیه پپتیدهای جهش‌یافته از ایجاد جهش در ساختار نهایی پپتید وحشی بعد از شبیه سازی در آب بدست آمده است، بنابراین پپتیدهای جهش‌یافته در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی RMSD کمتری داشته اند. علت تغییرات RMSD در طول شبیه سازی نسبت به لحظه شروع این است که بعلت این که پپتیدها ساختار کریستالوگرافی ندا شتند، ساختار اولیه آنها به کمک نرم افزار هایپرکم ساخته شد و تغییرات ساختار آنها در طول شبیه سازی پپتید، طبیعی است، هر چند در نهایت بعلت کوچک بودن پپتیدها، مانند پروتئین ها ساختار کاملا منظمی نمی توانند داشته باشند.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]




**شکل ۱**- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی پپتیدها درحضور 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

| | RMSD اسکلت اصلی (نانومتر) | میانگین شعاع چرخش (نانومتر) | میانگین سطح در دسترس حلال پروتئین (نانومتر مربع) | میانگین RMSF باقیمانده ها (نانومتر) |
|---|---|---|---|---|
| پپتید وحشی | ۱/۳۶ ± ۰/۰۶ | ۱/۰۸ ±۰/۱۳ | ۳۴/۴۴± ۲/۳۲ | ۰/۴۷ ±۰/۱۱ |
| جهش G23A | ۰/ ۶۶ ±۰/۰۸ | ۰/۹۹ ±۰/۰۳ | ۳۳/۰۸± ۱/۵۱ | ۰/۳ ± ۰/۱۳ |
| جهش F14I | ۰/۸۶ ±۰/۱ | ۱/۱ ±۰/۰۹ | ۳۴/۶۶±۱ /۷۵ | ۰/۵۲ ±۰/۱۷ |
| جهش D1H | ۰/۵۵ ±۰/۰۶ | ۰/۹۵ ±۰/۰۴ | ۳۲/۱۶± ۱/۹۶ | ۰/۳۱ ±۰/۱۳ |
| جهش D1A | ۰/۶ ±۰/۰۹ | ۰/۹۸ ±۰/۰۳ | ۳۳/۴۸± ۱/۹۳ | ۰/۳۴ ±۰/۱۴ |
| جهش G9W | ۰/۴۶ ±۰/۱۶ | ۱/۰۳ ±۰/۰۷ | ۳۵/۰۷± ۲/۰۷ | ۰/۳ ±۰/۱۳ |
| جهش ترکیبی D1A-G9W | ۰/۶۶ ±۰/۲ | ۱/۰۴ ±۰/۰۹ | ۳۴/۰۵± ۲/۰۵ | ۰/۳۷ ±۰/۲ |
| جهش ترکیبی D1H-G23A | ۰/۸۵ ±۰/۰۹ | ۱/۰۸ ±۰/۰۹ | ۳۴/۳۴± ۱/۵۶ | ۰/۴۹ ±۰/۱۵ |
| جهش ترکیبی D1H-G9W | ۰/۳۷ ±۰/۰۴ | ۰/۹۹ ±۰/۰۳ | ۳۳/۱۷± ۱/۴۲ | ۰/۱۵ ±۰/۰۵ |



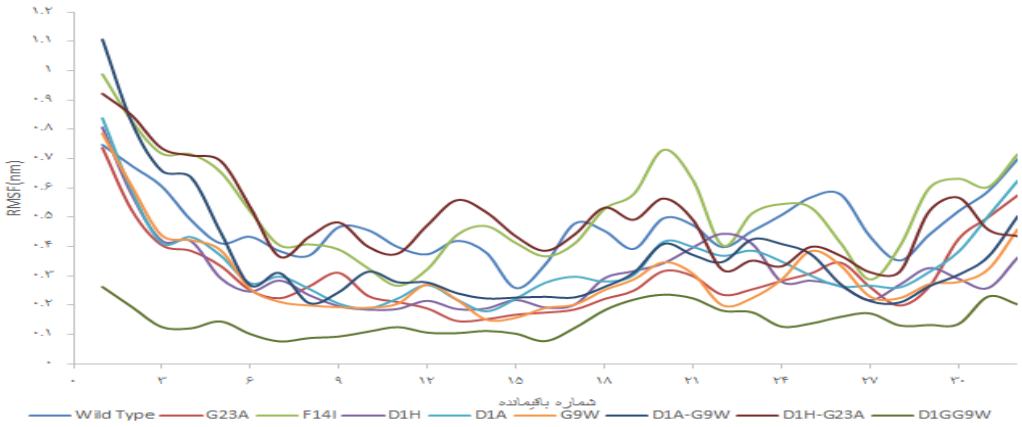
[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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 سامانه ها بود. بعلاوه مقادیر دما در همه سامانه ها 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، ساختارسوم پروتئین و فضایی که پروتئین اشغال می‌کند، است. نمودار Rg پپتیدها نشان داد که شعاع چرخش همه پپتیدها مشابه است. تغییرات کم شعاع چرخش پپتیدها نیز نشان‌دهنده به تعادل رسیدن ساختار پپتیدها می باشد(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 جهش ها اثر چندانی روی سطح در دسترس حلال پپتیدها نگذاشته است. همچنین مقادیر سطح 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 باقیمانده ها 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. درمورد پپتیدها به دلیل ساختار کوچک و بی نظمی که دارند نوسانات RMSF هم بیشتر از ساختار پروتئین‌های بزرگ است. در شکل ۲ تغییرات RMSF پپتیدها در۳۰ نانوثانیه آخرشبیه‌سازی 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 جهش ها در حضور آب غالبا کم می شود(شکل ۲).



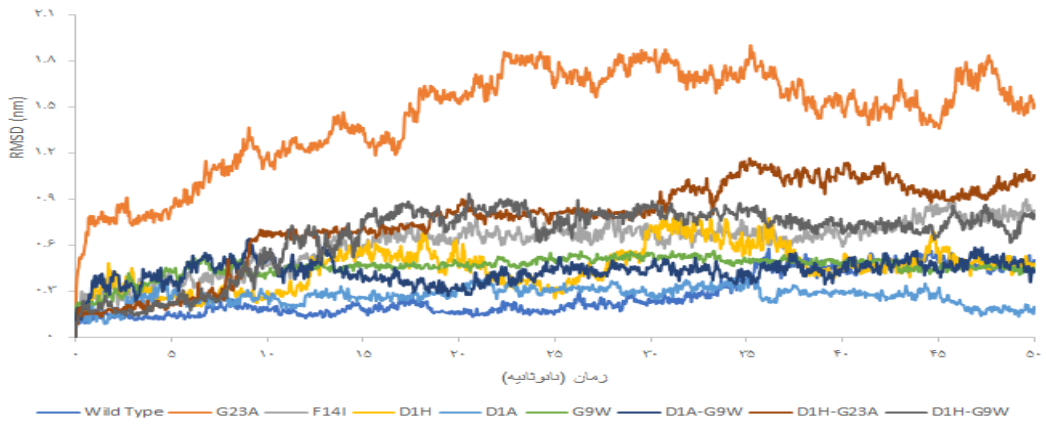

**شکل ۲**- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات اسکلت اصلی (RMSF) پپتیدها درحضور مولکولهای آب در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی

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

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

شکل ۳ نمایانگر RMSD اسکلت اصلی پپتیدها در حضور میسل SDS نسبت به لحظه شروع شبیه‌سازی درطول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی است. تغییرات ناچیز جذرمیانگین مربع انحرافات در سی نانوثانیه آخر شبیه سازی 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 درحضور میسل SDS و کافی بودن زمان شبیه سازی (۵۰ نانوثانیه) است. میانگین RMSD اسکلت اصلی پپتیدها درحضور میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی در جدول ۳ ذکر شده است. مقایسه مقادیر RMSD جدول ۱ و ۲ نشان می دهد 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 شبیه سازی در حضور میسل از ساختارهای نهایی پپتیدها در آب گرفته شده است و چون قبلا پپتیدها به تعادل رسیده بودند در حضور SDS هم تغییر جابجایی کمتری در اسکلت اصلی داشته اند.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]




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

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

نمودارهای انرژی پتانسیل و دما بیانگر به تعادل رسیدن ساختاری و دمایی پپتیدها در حضور میسل SDS بود. تغییرات ناچیز شعاع چرخش و سطح دردسترس حلال پپتیدهای وحشی و جهش‌یافته درحضور میسل SDS نیز حاکی از ثابت شدن این پارامترها و به تعادل رسیدن سامانه ها بود. مقادیر شعاع چرخش پپتیدها در حضور میسل SDS نسبت به حالت آب تقریبا تغییری نکرده بود ولی سطح دردسترس حلال اغلب پپتیدها در حضور میسل SDS کمی بیشتر از مقدار آنها درآب بود که احتمالا بعلت کاهش کشش سطحی آب و باز شدن ساختارپپتیدها در حضور میسل SDS بود (جدول ۳).

**جدول ۳**- میانگین پارامترهای پپتید ها در حضور میسل SDS در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی

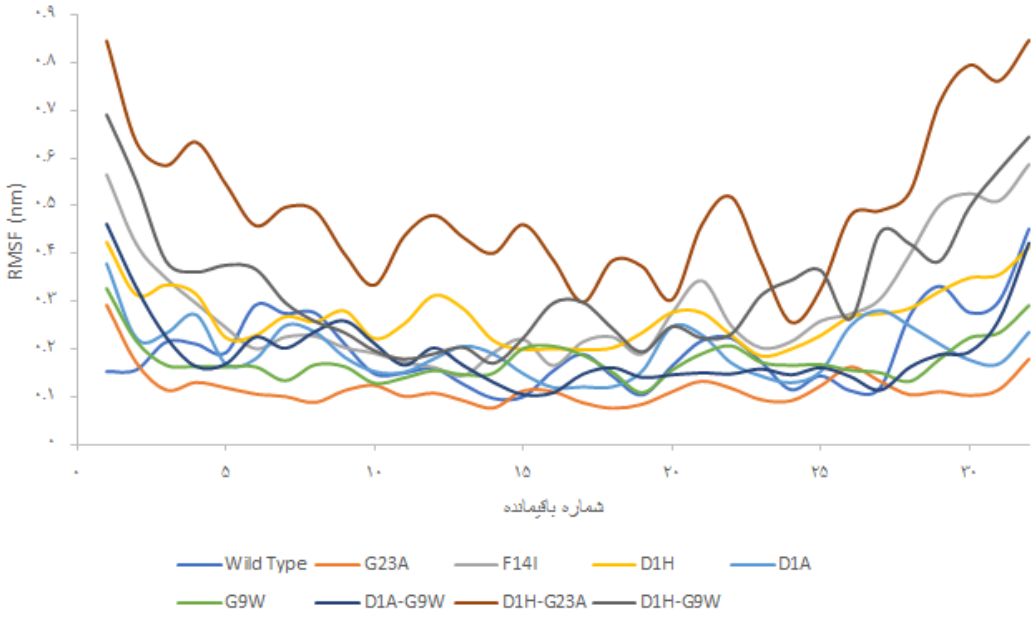
Table 3. The average of parameters during the last 30 ns simulation in existence of SDS micelle.

| | RMSD اسکلت اصلی (نانومتر) | شعاع چرخش (نانومتر) | سطح در دسترس کل پروتئین (نانومترمربع) | فاصله بین مرکز جرم های پپتید و SDS (نانومتر) | تعداد تماس ها بین پپتید و میسل | میانگین RMSF اسکلت اصلی(نانومتر) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| پپتید وحشی | ۰/۳۵ ± ۰/۱۳ | ۱/۰۷ ±۰/۰۷ | ۳۵/۲± ۱/۶ | ۱/۶۵ ±/۲۱ | ۴۸۰± ۵۲/۸ | /۲± /۰۸ |
| G23A | ۱/۶۵ ±/۱۲ | ۰/۹۸ ±/۰۳ | ۳۲/۷± ۰/۹۹ | ۰/۵۷ ± ۰/۱۴ | ۴۹۸/۱± ۳۶/۴ | /۲± /۰۴ |
| F14I | ۰/۷ ±/۰۷ | ۱/۲۳ ±/۰۳ | ۳۷/۰۶± ۱/۱۴ | ۱/۳۹ ±/۱۹ | ۵۳۶/۷± ۳۸/۷ | ۰/۱۲± /۱۳ |
| D1H | ۰/۵۱ ±/۱۲ | ۱/۲۱ ±/۰۷ | ۳۸/۳۵± ۱/۳۶ | ۱/۶۳ ±/۱۵ | ۵۶۴/۷± ۴۳/۱ | /۲۹± ۰/۰۶ |
| D1A | ۰/۲۹ ±/۰۵ | ۰/۹۶ ±/۰۲ | ۳۲/۲۱± ۱/۳۶ | ۱/۲۷ ±/۲۷ | ۳۵۲/۷± ۶۴/۵ | /۲۷± /۰۶ |
| G9W | ۰/۴۹ ±/۰۳ | ۰/۹۴ ±/۰۱ | ۳۲/۷۲± ۱/۰۲ | ۱/۹۵ ±/۱۲ | ۴۴۳/۲± ۳۸/۶ | /۲± ۰/۰۵ |
| D1A-G9W | ۰/۴۴ ±/۰۵ | ۱/۱۹ ±/۰۳ | ۳۶/۴± ۱/۱ | ۱/۸۶ ±/۱ | ۴۹۴± ۳۸/۳ | ۰/۱۸± ۰/۰۸ |
| D1H-G23A | ۰/۹۴ ±/۱۱ | ۱/۳ ±/۱۲ | ۳۸/۶۵± ۱/۹۷ | ۱/۲۹ ±/۳۲ | ۵۶۸/۸± ۷۳/۷ | /۱۹± ۰/۱۶ |
| D1H-G9W | ۰/۷۷ ±/۰۶ | ۱/۳۱ ±/۰۴ | ۳۸/۰۴± ۱/۱ | ۱/۴۶ ±/۱۸ | ۶۱۸/۴± ۸۲/۹ | ۰/۵± ۰/۱۴ |

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 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.



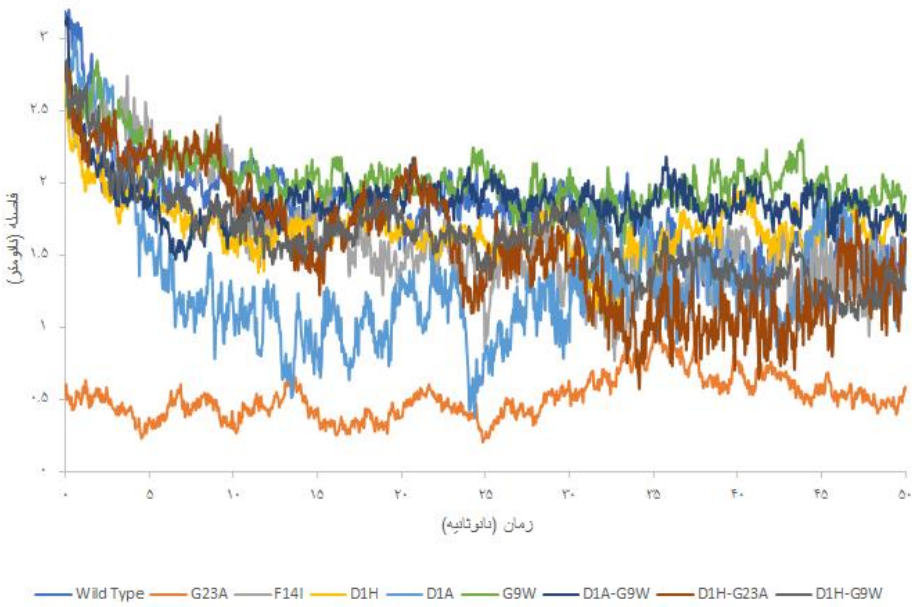
[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]




**شکل ۴**- نمودار تغییرات جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF) پپتیدها درحضور 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

نمودار تغییرات فاصله بین مرکزجرم 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 می‌شوند. همانطور که از این نمودار مشخص است جهش G23A 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 آخرشبیه سازی هم فاصله ثابت می شود.




**شکل ۵**- نمودار تغییرات فاصله بین مرکزجرم پپتیدها و میسل SDS درطول 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 در۳۰ 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



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

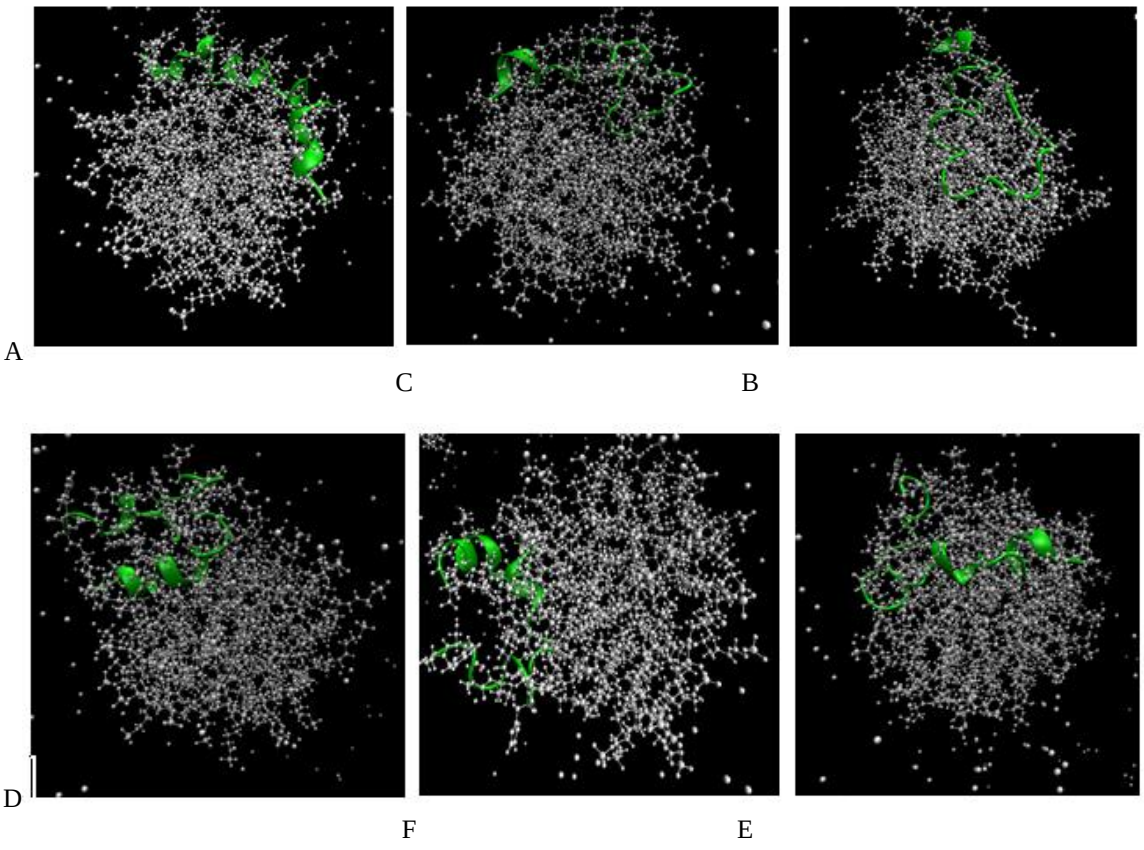
D1A و G9W تعداد تماس های بیشتری نسبت به پپتید وحشی داشته اند. همچنین تابع توزیع شعاعی که احتمال حضور پپتید نسبت به میسل SDS در فواصل مختلف را نشان می‌دهد، در ۳۰ نانوثانیه آخر بدست آمد. در جدول۴ بیشترین احتمال قرار گرفتن پپتید نسبت به میسل و مقدار این فاصله برحسب نانومتر گزارش شده است. هر چه این احتمال از یک بزرگتر باشد، احتمال جذب نسبت به جذب تصادفی بیشتر می شود. نتایج این جدول نشان می دهد که همه پپتیدها در فاصله کمی (بین ۱۰ تا ۱۳ انگستروم) با احتمال حدود سه برابر بیشتر از حالت تصادفی جذب میسل SDS شده اند. 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.

**جدول ۴**- فاصله ای که بیشترین احتمال حضور پپتید ها نسبت به میسل SDS رخ می دهد.

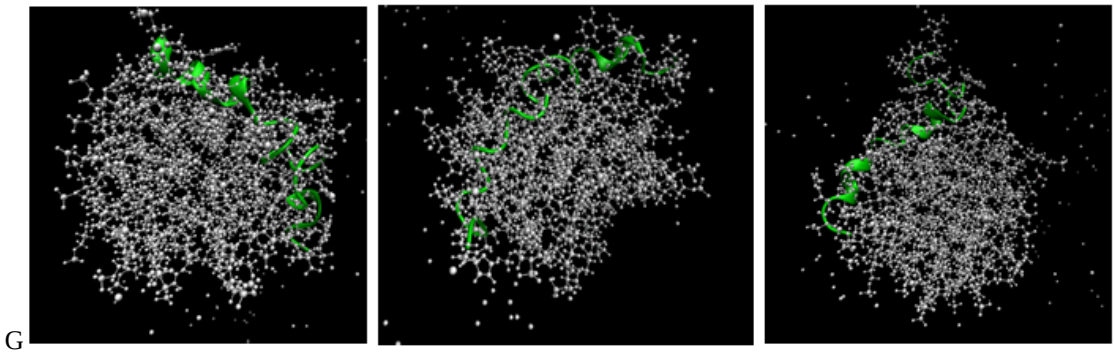
Table 4. The distance that the most probability existence of peptides to SDS micelle occur

| 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.




[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]




**شکل ۶**- ساختار نهایی پپتیدها درحضور 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 باقیمانده هایی که در مارپیچ آلفا یا دور(Turn) قرار دارند و درصد باقیمانده هایی که در پیچه تصادفی قرار دارند در طول ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی محاسبه و در جدول ۵ ذکر شده است. نتایج این جدول نشان می دهد که اغلب پپتیدها در حضور میسل SDS تا حدی ساختارهای دوم منظم را نسبت به حالت عدم حضور میسل SDS از دست داده اند و ساختارهای بی نظم و کویل افزایش پیدا کرده اند که این مساله بعلت کوچک بودن پپتید و کاهش کشش سطحی در حضور میسل SDS که باعث واسرشته شدن پروتئین ها می شود، 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

| پپتد | مجموع درصد مارپیچ آلفا و دور در آب | مجموع درصد مارپیچ آلفا و SDSدور در حضور میسل | درصد پیچه در آب تصادفی | درصد پیچه تصادفی در SDSحضور میسل |
|---|---|---|---|---|
| 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 |

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

### محاسبه انرژی آزاد اتصال پپتیدها به میسل SDS

نتایجی که تاکنون ذکر شد بطور کیفی جذب پپتید توسط میسل SDS را تایید می کند. به منظور بررسی کمی جذب پپتید توسط میسل انرژی اتصال پپتید به میسل با روش MM/PBSA محاسبه شد(جدول ۵). درضمن مجموع انرژی واندروالس و انرژی آبپوشی غیرقطبی و همچنین مجموع انرژی الکتروستاتیک وانرژی 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 می توان نتیجه گرفت که احتمالا پپتید خاصیت ضدمیکروبی قوی‌تری دارد. جدول ۶ میانگین انرزی آزاد اتصال بدست آمده در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی پپتیدها به میسل SDS را نشان می دهد.

**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

| | مجموع انرژی واندروالسی و انرژی آبپوشی غیرقطبی (کیلوژول برمول) | مجموع انرژی الکتروستاتیک و انرژی آبپوشی قطبی (کیلوژول برمول) | انرژی اتصال (کیلوژول برمول) |
|---|---|---|---|
| D1A-G9W | -۶۲۵/۴ | -۲۵۰۷۷/۳ | -۲۵۶۹۷/۳± ۲۹/۵ |
| D1H-G23A | -۷۰۵/۸ | -۲۴۱۷۰/۳ | -۲۴۸۷۹/۱± ۳۷/۳ |
| D1H | -۶۸۸/۲ | -۲۳۹۸۹/۶ | -۲۴۶۷۵/۸± ۲۹/۵ |
| D1H-G9W | -۷۲۰/۹ | -۲۲۶۱۳/۴ | -۲۳۳۱۹/۴± ۷۴/۳ |
| D1A | -۴۰۳/۹ | -۲۱۷۴۱ | -۲۲۱۴۴/۹± ۳۲/۳ |
| G9W | -۵۰۹/۸ | -۲۰۶۵۲/۸ | -۲۱۱۶۱/۵± ۲۷/۲ |
| پپتید وحشی | -۵۸۲/۶ | -۲۰۵۱۱/۳ | -۲۱۰۹۴/۱± ۲۷/۲ |
| F14I | -۶۵۱/۳ | -۱۹۰۲۱/۱ | -۱۹۶۷۲/۴± ۲۷/۶ |
| G23A | -۵۸۶/۱ | -۱۷۹۲۱/۲ | -۱۸۵۰۷/۱± ۱۹/۸ |

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 < پپتید وحشی < F14I < G23A

بنابراین جهش های ترکیبی غالبا 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 احتمالا حدود ۲۰ درصد قدرت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به پپتید هیستاتین ۳ وحشی دارد. مجموع سهم انرژی الکتروستاتیک و انرژی آبپوشی گروه های قطبی بین پپتیدها ومیسل از مجموع سهم انرژی واندروالسی و انرژی آبپوشی گروههای غیرقطبی بین پپتیدها ومیسل بیشتر و مهم تر بوده است. بعبارت دیگر نیروی غالب در میانکنش پپتیدها با میسل SDS نیروی الکتروستاتیک بوده است که با توجه به منفی بودن بارسطح 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 بعلت بار مثبت آنها منطقی می باشد. البته جهش های D1H-G23A وD1H 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 می‌تواند گزینه های مناسبی برای انجام آزمایشات تجربی باشد.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

## نتایج تجربی

### سنجش خاصیت ضد میکروبی

به‌منظور بررسی خاصیت ضدمیکروبی پپتید وحشی و جهش D1A-G9Wساخته شده آزمون MIC به روش ریز رقت‌سازی انجام شد( جدول ۷). نتایج حاصل از سنجش MIC نشان داد که مقدار MIC برای باکتری انتروکوکوس فکالیس ۳۷/۵ µg/ml، برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس ۷۵ µg/ml بدست آمد میزان MIC با پپتید وحشی بر روی این دو باکتری بیشتر از ۳۰۰ µg/ml بود. مقادیر MIC پپتید وحشی و جهش یافته D1A-G9W برای باکتری های گرم منفی اختلافی را نشان نداد. نتایج نشان‌دهنده تاثیر آنتی باکتریال این پپتید بر روی طیفی از باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت می‌باشد.

**جدول۷** – نتایج مربوط به سنجش MIC به روش ریز رقت‌سازی 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 mut peptides

| باکتری | آزمون | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | MIC (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| سالمونلا تیفی موریم | پپتید جهش‌یافته | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سالمونلا تیفی موریم | پپتید وحشی | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سالمونلا تیفی موریم | کنترل منفی آب | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سالمونلا تیفی موریم | کنترل مثبت کلرامفنیکل | – | + | + | + | + | + | + | + | ۳۰۰ |
| انتروکوکوس فکالیس | پپتید جهش‌یافته | – | – | – | – | + | + | + | + | ۳۷/۵ |
| انتروکوکوس فکالیس | پپتید وحشی | – | + | + | + | + | + | + | + | ۳۰۰ |
| انتروکوکوس فکالیس | کنترل منفی آب | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| انتروکوکوس فکالیس | کنترل مثبت آمپی‌سیلین | – | – | – | – | – | – | – | – | <۲/۳۴ |
| سراشیا مارسسنس | پپتید جهش‌یافته | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سراشیا مارسسنس | پپتید وحشی | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سراشیا مارسسنس | کنترل منفی آب | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| سراشیا مارسسنس | کنترل مثبت کلرامفنیکل | – | – | + | + | + | + | + | + | ۱۵۰ |
| باسیلوس سوبتیلیس | پپتید جهش‌یافته | – | – | – | + | + | + | + | + | ۷۵ |
| باسیلوس سوبتیلیس | پپتید وحشی | – | + | + | + | + | + | + | + | ۳۰۰ |
| باسیلوس سوبتیلیس | کنترل منفی آب | + | + | + | + | + | + | + | + | / |
| باسیلوس سوبتیلیس | کنترل مثبت آمپی‌سیلین | – | – | – | – | – | – | – | – | <۲/۳۴ |

+ 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 میلی‌لیتر

## بحث

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

در این مطالعه ابتدا پپتید هیستانین ۳ وحشی در حضور آب و در مجاورت میسل SDS به عنوان مدل ساده ای از غشا باکتری بطورجداگانه به مدت ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی شد. نمودارهای تغییرات انرژی پتانسیل کل سامانه، دما، RMSD و شعاع چرخش پپتید طی زمان شبیه‌سازی، صاف شدن این نمودارها و درنتیجه به تعادل رسیدن سامانه ها به‌خصوص در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی 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 وF14I وD1H و D1A-G9W وD1H-G23A وD1A-G9W و D1H-G9W در



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

پپتید هیستاتین ۳ طراحی شد و مراحل شبیه سازی در آب و در مجاورت میسل SDS برای پپتیدهای جهش یافته تکرار شد. در اکثر جهش‌ها RMSF باقیمانده جهش‌یافته نسبت به باقیمانده ی پپتید وحشی کمتر بوده و نیز مقدار میانگین RMSF همه باقیمانده ها در همه جهش یافته ها کمتر از مقدار پپتید وحشی بود. سطح دردسترس حلال کل پپتیدها درحضور میسل SDS بیشتر از میزان این پارامتردرحالت آزاد (در آب) بود که نشان‌دهنده باز شدن جزیی پپتیدها درحضور میسل SDS بود. نتایج حاصل از فاصله مرکز جرم و تابع توزیع شعاعی پپتید و میسل SDS، نشان‌دهنده این بود که پپتیدها با داشتن بار مثبت در دام جاذبه الکتروستاتیک میسل SDS با بار سطحی منفی افتاده اند و جذب آن شده اند. همچنین نتایج شبیه سازی نشان می دهد، پپتیدهای ضدمیکروبی بعلت کوچک بودن درحالت آزاد ساختار دوم کمی دارند ولی درحضور میسل SDS ساختارهای دوم منظم بازهم کمتر می شوند. همچنین نتایج محاسبه انرژی آزاد با روش MM/PBSA اتصال پپتیدها با میسل SDS نشان داد ماهیت اتصال پپتیدها به میسل SDS از نوع میانکنش های الکتروستاتیک است. بنابراین برای افزایش قدرت اتصال پپتیدها به میسل باید روی جهش هایی که بار مثبت پپتید را افزایش می دهند یا بار منفی پپتید را از بین می برند تمرکز بیشتری نسبت به جهش هایی که فقط باعث افزایش هیدروفوبیسیتی پپتید می شوند، داشته باشیم. این مساله با کاهش قدرت اتصال جهش های F14Iو G23A نسبت به پپتید وحشی که فقط هیدروفوبیسیتی پپتید را افزایش می دادند، تایید می شود. بر اساس نتایج بدست آمده از بین جهش های طراحی شده جهش ترکیبی D1A-G9W انرژی آزاد اتصال منفی‌تری نسبت به بقیه و پپتید وحشی دارد و می توان نتیجه گرفت قدرت ضدباکتری مناسبتری دارد. علت اتصال بهتر این جهش را می تواند کاهش همزمان بار منفی پپتید و افزایش هیدروفوبیسیتی آن دانست.

بررسی تجربی اثر ضد میکروبی این پپتید انجام شد. آزمون MIC نشان داد که پپتید جهش یافته علیه باکتری‌های گرم مثبت به خوبی عمل کرده و منجربه مهار رشد آن‌ها می‌شود ولی اثری برروی باکتری‌های گرم منفی مشاهده نشد. مطالعه ای که بر روی پپتید جهش یافته نوترکیب انجام شده است نشان داد که میزان MIC این پپتید بر روی باکتری استافیلوکوک اورئوس µg/ml ۱۵۰ در صورتی که بر روی باکتری های گرم منفی تاثیری ندارد که تاییدی بر نتایج قبلی به دست آمده از همین تیم می باشد (Tavakoli et al., 2022). تفاوت ساختار غشای باکتریهای گرم مثبت و منفی می تواند از جمله دلایل تاثیر متفاوت این پپتید بر روی آنها باشد((Friedrich et al., 2000; Oyama et al., 2017.

فردریچ و همکاران، MIC چندین پپتید ضدمیکروبی برروی باکتری انتروکوکوس فکالیس را بررسی کردند که چهار پپتید cp26، cp29، ایندولیسیدین و cp11cn با غلظتی بیشتر از µg/ml ۶۴ این باکتری را مهار کردند. مطالعات تجربی نشان داد پپتید هیستاتین ۳ جهش یافته (D1A-G9W) با میزان کمتری می تواند این باکتری را مهار کند (Friedrich et al., 200).

## نتیجه‌گیری کلی

پپتیدهای ضدمیکروبی به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید، به دلیل طیف وسیع فعالیت خود، به ویژه در برابر باکتری‌های مقاوم به دارو و همچنین سرعت عمل بالا و احتمال کمتر بروز مقاومت میکروبی، مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ویژگی‌ها آن‌ها را به گزینه‌ای امیدوارکننده در درمان عفونت‌های میکروبی تبدیل کرده است. بنابراین برخی از پپتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند به‌عنوان عوامل درمانی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین آن‌ها می‌توانند در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های سنتی استفاده شوند و به دلیل فعالیت هم افزایی، اثرات مطلوبی در کاهش MIC (Minimum Inhibitory Concentration)و MBC (Minimum Bactericidal Concentration) آن آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. هیستاتین‌ها به‌عنوان خانواده‌ای از این پپتیدها دارای خصوصیات متنوعی هستند که مهم‌ترین آن‌ها، خاصیت ضدمیکروبی علیه سویه‌های مقاوم به دارو است. در این پژوهش، پپتید هیستاتین۳ و چند جهش جدید در آن برای اولین بار طراحی شد و در مجاورت میسل SDS شبیه سازی دینامیک مولکولی شد. سپس از میان جهش‌های انجام شده، جهش D1A-G9W با کمترین انرژی اتصال به میسل SDS انتخاب شد و جهت بررسی خواص ضدمیکروبی، سنتز شد. نتایج آزمون‌های میکروبی آن، نشان‌دهنده تاثیرگذاری این پپتید برروی باکتری‌های گرم مثبتی همچون انتروکوکوس فکالیس و باسیلوس سوبتیلیس است. با توجه به پژوهش انجام شده، فعالیت ضدمیکروبی این پپتید و امکان تولید آن، می توان از این پپتید در صنایع دارویی، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا درکنار آنتی‌بیوتیک‌های سنتی برای افزایش کارایی آن‌ها، بهره گرفت. نتایج این پژوهش نشان می دهد علیرغم ساده بوده سامانه های مدل مورد استفاده در شبیه سازی دینامیک مولکولی و پیچیده بودن غشا باکتری ها، می توان با روش های نسبتا ساده و کم هزینه شبیه سازی دینامیک مولکولی میانکنش پپتیدهای ضد میکروبی را با میسل SDS بعنوان مدل غشا باکتری بررسی کرد و تغییر قدرت ضد باکتری پپتیدهای جهش یافته دلخواه را تاحد زیادی پیشگویی کرد. این مساله می تواند باعث صرفه جویی در وقت و هزینه های طراحی پپتیدهای ضدمیکروبی جدید می شود



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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 هیدوفوبیسیتی آن تمرکز کرد.

**تشکر و قدردانی**

این پژوهش باحمایت مالی دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

## REFERENCES

**Andrews, J.M.** 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial Chemotherapy 48:5-16.

**Akula, S. Welinder, C. Fu, Z. Olsson, AK. 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 α-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-a1 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

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]

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 جهش های جدید در پپتید هیستاتین۳ به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی آن. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۱: ۴۴-۶۰.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.4.8 ]

[ DOI: 10.22034/NBR.11.3.44 ]