(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

مقاله پژوهشی

طراحی سازه ژنی ترکیبی جهت تولید نوترکیب باکتریوسین لاتروسپورولین و آنالیز بیوانفورماتیکی پیش‌ساز پروتئینی با هدف بررسی نقش انتهای آمینی دمین SH۲

- **سیمین صالح‌زاده**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **محمد طباطبایی** *: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **عبدالله درخشنده**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **حمیدرضا کربلایی‌حیدری**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: آبان ١٣٩٩ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩٩

چکیده

باکتریوسین‌ها پپتیدهای تولید شده توسط باکتری‌ها می‌باشند که فعالیت ضدمیکروبی این پپتیدها بر علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها شناخته شده است. به‌منظور تولید مقادیر بالای باکتریوسین با استفاده از فناوری DNA نوترکیب و نیاز به خنثی کردن اثر سمی پپتید و تولید فرم محلول پروتئین می‌توان از برخی پپتیدها که به‌عنوان چاپرون‌ها عمل می‌کنند، استفاده نمود. لاتروسپورولین یک باکتریوسین ٤٩ اسیدآمینه‌ای می‌باشد که به‌طور طبیعی از باکتری *Brevibacillus laterosporus* GI-۹ ترشح می‌شود. در مطالعه حاضر، برای اولین بار از انتهای آمینی دمین SH۲ به‌عنوان قطعه پپتیدی کمکی جهت تولید نوترکیب باکتریوسین لاتروسپورولین استفاده شد. در این مطالعه سازه ژنی ترکیبی به‌صورت پیش‌ساز پروتئینی حاوی دنباله هیستیدینی، انتهای آمینی دمین SH۲ (N-SH۲)، جایگاه برش پروتئاز انتروکیناز و در نهایت پپتید لاتروسپورولین طراحی گردید و به‌کمک آنالیزهای بیوانفورماتیکی اثر دمین N-SH۲ بر حلالیت و سطوح آب گریز پروتئین هدف مطالعه شد. نتایج نشان داد دمین N-SH۲ با دارا بودن سطوح مناسب آب گریز می‌تواند به‌عنوان یک چاپرون مناسب، مانع از مجتمع شدن و به‌هم ریختگی ساختاری غیرقابل برگشت باکتریوسین لاتروسپورولین گردد. به‌علاوه آنالیزهای انجام شده نشان داد امکان بیان پروتئین هدف با تاخوردگی مناسب در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد. مطالعه حاضر نشان داد دمین N-SH۲ می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت تولید نوترکیب انواع باکتریوسین‌ها در باکتری اشریشیا کلی عمل نماید.

کلمات کلیدی: لاتروسپورولین، انتهای آمینی دمین SH۲ ، تولید نوترکیب، بیوانفورماتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mtabatabaei2003@yahoo.co.uk

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

مقدمه

باکتریوسین‌ها پپتیدهایی هستند که طی فرایند تولید وابسته به ریبوزوم در باکتری‌ها تولید می‌شوند. فعالیت ضدمیکروبی این پپتیدها بیش‌تر بر علیه گونه‌ای نزدیک به باکتری مولد می‌باشد (Jack و همکاران، ۱۹۹۵). باکتریوسین‌ها فعالیت ضدمیکروبی قابل قبولی بر علیه گستره وسیعی از عوامل بیماری‌زا، ویروس‌ها و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهند (Nascimento و همکاران، ۲۰۰۶؛ Fontana و همکاران، ۲۰۰۶). این پپتیدهای ضدمیکروب، کاتیونیک و آب‌گریز، نفوذکننده در غشای سیتوپلاسمی هستند که شامل ۳۰ تا ۶۰ اسیدآمینه می‌باشند (McAuliffe و همکاران، ۲۰۰۱) و براساس ساختار و عملکرد خود به کلاس‌های I (لانتی‌بیوتیک‌ها)، II (شامل تحت کلاس a,b,c,d) و III تقسیم‌بندی می‌شوند (Cotter و همکاران، ۲۰۰۵؛ Svetoch، ۲۰۰۵).اگرچه اغلب باکتریوسین‌ها از لاکتوباسیلوس‌ها تولید می‌شوند، اما تولید آن‌ها از دیگر باکتری‌ها ازجمله باسیلوس‌ها هم گزارش شده است (James و همکاران، ۲۰۱۳) تعداد زیادی از گونه‌های باکتریایی حداقل یک نوع باکتریوسین را به‌منظور تقویت سیستم ایمنی خود تولید می‌کنند (Riley، ۱۹۹۸؛ Riley و همکاران، ۲۰۰۳). باکتریوسین‌ها به‌خاطر داشتن مکانیسم‌های عمل مختلف و فعالیت برعلیه طیف‌وسیعی ازعوامل بیماری‌زای‌مقاوم به آنتی‌بیوتیک، می‌توانند به‌عنوان نگه‌دارنده در جلوگیری از فساد مواد غذایی و آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار گیرند (Tagg و همکاران، ۱۹۷۶). به‌دلیل میزان پایین تولید باکتریوسین از سویه مولد، خالص‌سازی این پپتیدها یک فرایند زمان بر، پر هزینه و کم بازده از لحاظ صنعتی است (Li و همکاران، ۲۰۰۸). سیستم تولید باکتریوسین می‌تواند شامل بیان نوترکیب پپتید در گونه باکتری مولد (Guyonnet و همکاران، ۲۰۰۰)، باکتری‌های‌اسیدلاکتیکی (Kleerebezem و همکاران، ۱۹۹۷)/*شریشیا کلی* (Miller و همکاران، ۱۹۹۸) و یا طی فرایند تولید شیمیایی (Fimland و همکاران، ۱۹۹۶) باشد. علی‌رغم تولید پپتید در حجم بالا در تولید شیمیایی باکتریوسین‌ها، صرف هزینه بالا برای تولید پپتیدهایی با پیوندهای دی سولفید و تغییرات پس از ترجمه از معایب این روش می‌باشد (Fimland و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹). پیشرفت‌هایی که در زمینه‌فناوری تولید DNAنوترکیب به‌وجود آمده است این شانس را به محققین می‌دهد که بتوانند باکتریوسین‌های نوترکیب موثر با حجم تولیدی بالا فراهم کنند. از مشکلات سیستم بیانی‌باکتریایی می‌توان به‌عدم تشکیل‌صحیح پیوندهای دی سولفیدی به‌خاطر نبود چاپرون‌های مناسب و محیط احیایی سیتوپلاسم و عدم مطابقت صحیح کدون‌های ژن اولیه باکتریایی با ماشین ترجمه سلول میزبان اشاره نمود (Pacheco و همکاران، ۲۰۱۲؛ Terpe، ۲۰۰۶). بنابراین کارآمدی سیستم تولید و خالص‌سازی باکتریوسین نوترکیب نیازمندرعایت مواردی‌چون تشکیل‌صحیح پیوند دی‌سولفیدی، افزایش بیان پپتید و خالص‌سازی راحت، سریع و ارزان آن می‌باشد. با وجود این مشکلات، سیستم بیانی باکتریایی به‌دلیل صرفه اقتصادی، کاربرد راحت و استفاده راحت‌تر از مهندسی ژنتیک توصیه می‌شود. در تولید پپتیدهای نوترکیب به‌دلیل وزن ملکولی پایین،سمیت احتمالی، امکان هضم آنزیمی سریع و خالص‌سازی و داشتن پپتیدفعال از نظر عملکرد، تمامی تلاش‌ها در زمینه مهندسی ژنتیک و طراحی سازه‌های ژنی در جهت مرتفع ساختن این مشکلات به‌کار گرفته شده‌اند. پپتیدهای نوترکیب تولید شده می‌توانند تحت اثر پروتئازها تجزیه شوند و یا برای سلول میزبان سمی باشند. بنابراین می‌بایست این پپتیدها به یک‌سری پروتئین‌های کمکی آنیونیک متصل شوند (McCoy و همکاران، ۱۹۹۷؛ Sørensen و همکاران، ۲۰۰۵) تا با خصوصیات فیزیکی - شیمیایی و ساختار خاص خود بتوانند بار مثبت این پپتیدها را خنثی و مانع فعالیت سمی آن‌ها بر علیه سلول میزبان شوند و از تجزیه شدن آن‌ها جلوگیری کنند (Esposito و همکاران، ۲۰۰۶؛ Chatterjee و همکاران، ۲۰۰۶). باکتریوسین لاتروسپورولین (= LTS Laterosporulin) یک باکتریوسین ۴۹ اسیدآمینه‌ای با وزن ملکولی ۵۷۵۰ دالتون و متعلق به‌گروه IId باکتریوسین‌ها می‌باشد که از باکتری *Brevibacillus laterosporus* GI-۹ ترشح می‌شود. این پپتید دارای خاصیت ضدمیکروبی بر علیه باکتری‌هایی گرم مثبت مانند *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی ازقبیل *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد و هم‌چنین نسبت به آنزیم‌های پروتئولیتیک، تغییرات pH و دما مقاوم است (Singh و همکاران، ۲۰۱۲). این پپتید در ساختار خود به‌دلیل دارا بودن ۶ سیستئین، سه پیوند دی سولفیدی دارد (پیوند دی سولفیدی بین سیستئین ۳ و ۴۲، ۵ و ۳۴، ۱۹ و ۵۰) که در ایجاد صفحات بتا به‌هم پیچیده در ساختار این باکتریوسین دخالت دارند (Singh و همکاران، ۲۰۱۵). در این مطالعه، برای اولین‌بار به‌منظور تولید باکتریوسین نوترکیب لاتروسپورولین از فرم موتانت انتهای آمینی دمین (Domain) SH۲ (حدود ۱۱۹ اسید آمینه) متعلق به پروتئین تیروزین فسفاتاز به‌عنوان یک قطعه پپتیدی کمکی (Carrier proteins) در نقش چاپرون، استفاده شد (Fairlie و همکاران، ۲۰۰۲؛ Pawson، ۲۰۰۴). ساختار دمین SH۲ شامل دو ناحیه مارپیچ آلفا و یک صفحه آب‌گریز بزرگ موازی معکوس بتا است. دمین SH۲ نقش‌های مهمی در مکانیسم‌های مختلف سلولی مانند پاسخ‌های ایمنی، هموستازی و بازآرایی اسکلت سلولی بازی می‌کند. هم‌چنین، نشان داده شده است که اتصال SH۲ به تیروزین فسفوریله مولکول هدف، باعث تنظیم بیان ژن‌های مختلف می‌شود (Mayer و همکاران، ۲۰۱۷).تاکنون یک پروتئین ترکیبی شامل پروتئین تیروزین فسفاتاز با دمین SH۲ به‌صورت نوترکیب در بافت انسانی تولید شده

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

است (Ahmad و همکاران، ۱۹۹۳). هم‌چنین Fairlie و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقی در تولید پپتیدهای با زنجیره کوتاه از فرم موتانت انتهای آمینی دمین SH۲ (N-SH۲) به‌عنوان قطعه پپتیدی کمکی استفاده کردند و اثر آن بر میزان بیان پپتیدها را مورد بررسی قرار دادند. بیوانفورماتیک دانش جامعی متشکل از علوم مختلف مانند علوم کامپیوتر و مهندسی است که هدف آن گردآوری اطلاعات و پردازش آن‌ها در زمینه علوم زیستی است که می‌توان به‌وسیله آن مشخصات و خصوصیات فیزیکی، ساختاری و کارآیی پروتئین الحاقی طراحی شده را قبل از انجام آزمایش و بیان آن مورد ارزیابی قرار داد (Mohammad و همکاران، ۲۰۱۶). در تحقیق حاضر، هدف طراحی سازه ژنی پروتئین الحاقی (Fusion protein) لاتروسپورولین به‌همراه دمین کمکی N-SH۲ و بررسی بیوانفورماتیکی این پروتئین، سنجیدن خصوصیات فیزیکی- شیمیایی و اثر N-SH۲ بر حلالیت و سطوح آب گریز این پروتئین و پیش‌بینی چگونگی اثرات N-SH۲ در تاخوردگی صحیح پروتئین در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحی سازه ژنی: به‌منظور طراحی ژن پروتئین الحاقی مورد نظر، ناحیه N-SH۲ (Fairlie و همکاران، ۲۰۰۲) و توالی ۱۵۰ بازی ژن باکتریوسین لاتروسپورولین از NCBI (HE ۵۷۹۱۶۷) گرفته شد. ژن N-SH۲ در قسمت آمینی ژن لاتروسپورولین قرار گرفت. مابین N-SH۲ و لاتروسپورولین جایگاه برش آنزیم انتروکیناز طراحی گردید. بالادست ژن N-SH۲، توالی His tag و پپتید نشانه pelB قرار گرفت. هم چنین دو طرف این توالی طراحی شده جایگاه آنزیم‌های محدود کننده *Nde*I و *Xho* I درنظر گرفته شد. توالی طراحی شده بر طبق سازگاری با باکتری *اشریشیا کلی* سویه K۱۲ بهینه‌سازی کدونی گردید.

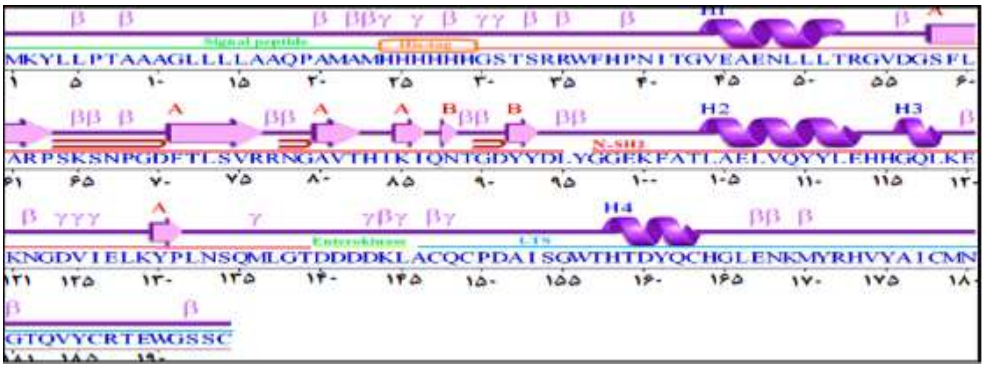
ابزار بیوانفورماتیک: ساختار سه بعدی پروتئین الحاقی LTS-N-SH۲ با استفاده ازنرم‌افزار ITASSER مدل‌سازی شد و انرژی آن بهینه گردید. سپس ساختار دوم N-SH۲-LTS و N-SH۲ توسط PDBsum ترسیم گردید. هم‌چنین، کیفیت استریوشیمیایی ساختار پروتئین توسط نرم‌افزار Procheck مورد بررسی قرار گرفت (Morris و همکاران، ۱۹۹۲؛ Laskowski و همکاران، ۱۹۹۳). نمودار راماچاندران (Ramachandran plot) جهت تعیین کیفیت پروتئین الحاقی مدل شده، مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین حلالیت و پیش‌بینی آب گریزی از نرم‌افزار Pro-Sol و Protein-sol patches استفاده گردید (Hebditch و همکاران، ۲۰۱۷؛ ۲۰۱۹). هم‌چنین، مناطق آب‌دوست و آب‌گریز پروتئین الحاقی N-SH۲-LTS نیز به‌صورت نمودار با کمک نرم‌افزار PepCalc ترسیم گردیده است.

نتایج

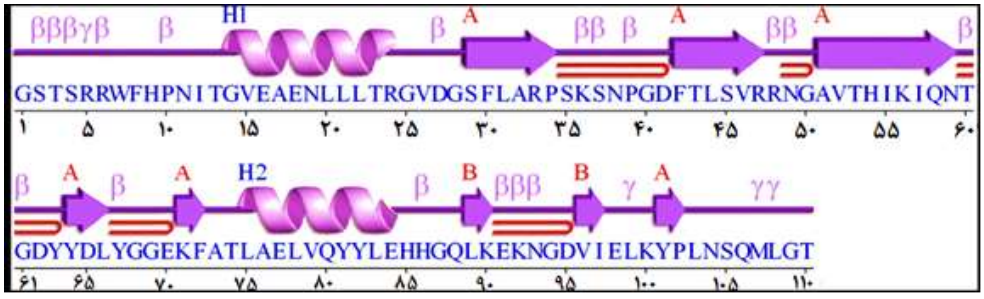
ساختار طراحی شده پروتئین الحاقی حاوی یک قسمت پپتید نشانه در انتهای آمینی پروتئین (رنگ سبز)، قسمت N-SH۲ (رنگ قرمز)، توالی انتروکیناز (رنگ زرد) و قطعه لاتروسپورولین به رنگ آبی می‌باشد (شکل ۱). شکل ۱ ساختار دوم پروتئین الحاقی N-SH۲-LTS و شکل ۲ نشان‌دهنده ساختار N-SH۲ می‌باشد. هم‌چنین ساختار سه بعدی پروتئین N-SH۲-LTS نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. شکل ۴ در دسترس بودن اسیدهای آمینه و کیفیت شیمی فضایی پروتئین N-SH۲ -LTS را نشان می‌دهد که در حد مناسبی قرار دارد. بررسی نمودار راماچاندران نشان داد که کیفیت مدل ارائه شده نسبتاً مطلوب است (شکل ۵). آنالیز مربوط به حلالیت‌پذیری (solubility) پروتئین N-SH۲-LTS (شکل ۶) نشان داد که حلالیت این پروتئین در مقایسه با میزان میانگین حلالیت مناسب پروتئین‌های محلول *اشریشیا کلی* (۴۰٪)، ۳۵/۴٪ است که حلالیت نسبی متوسطی را دارا می‌باشد. میانگین حلالیت پروتئین‌های محلول *اشریشیا کلی* از داده‌های تجربی اخذ گردیده‌است (Niwa و همکاران، ۲۰۰۹). در شکل ۶ حلالیت لاتروسپورولین، N-SH۲ و پروتئین الحاقی به‌صورت جداگانه به تصویر کشیده شده است. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد ساختار پروتئین الحاقی پس از مدل‌سازی تغییرات بسیار محسوسی را از نظر حلالیت در مقایسه با ساختار طبیعی لاتروسپورولین (۳۶/۳٪) نشان نمی‌دهد، باوجوداین که دستخوش تغییراتی بوده‌است. مناطق آب‌گریز و آب‌دوست پروتئین الحاقی نیز در شکل ۷ نشان داده شده است که مناطق بالای نمودار نشان‌دهنده قسمت‌های آب‌دوست و قسمت‌های پایین نمودار نشان‌دهنده قسمت‌های آب‌گریز پروتئین در طول توالی پروتئین الحاقی می‌باشد. نرم‌افزار Protein-sol patches براساس فرمت pdb، قسمت‌های آب‌گریز را در سطح پروتئین محاسبه کرده است (شکل ۸) و اجازه شناسایی مناطقی که ممکن است بر رفتار و پایداری ساختار پروتئین تأثیر بگذارد را می‌دهد. آب‌گریزی توسط مقیاس NPP (The ratio of non-polar to polar SASA (NPP ratio) values)، از ۰/۶ (قطبی‌تر) به ۲/۵ (غیرقطبی‌تر) نشان داده شده است. یک نوار گرافیک اضافی نیز حداکثر نسبت NPP را در زمینه نواحی دارای رابطه متقابل و بدون رابطه متقابل (Maxima found for interface and non-interface regions) براساس قطعه Fab (The antigen-binding fragment (Fab) is a region on an antibody that binds to antigens) به‌عنوان رفرانس (شاخص) نشان می‌دهد، که به‌طور چشمگیری باعث افزایش کارایی نرم‌افزار می‌شود (Hebditch و همکاران، ۲۰۱۹). Protein-sol patches نسبت نواحی قطبی و غیرقطبی را در پپتید لاتروسپورولین، N-SH۲ و پروتئین الحاقی به تصویر کشیده است. نواحی آب‌گریز با رنگ سبز نشان داده شده است. همان‌طورکه در تصویر (شکل ۸) دیده می‌شود

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

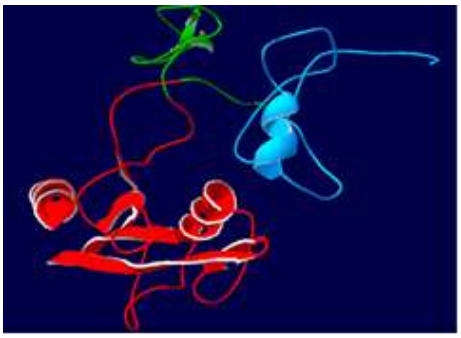
لاتروسپورولین دارای آب‌گریزی کم‌تری است درحالی‌که N-SH۲ آب گریزی بیش‌تری را نشان می‌دهد و به‌نسبت وقتی به پپتید لاتروسپورولین متصل شد آب‌گریزی ساختار را افزایش داده است. مطالعه حاضر این امکان را فراهم نمود تا مناسب‌بودن پروتئین الحاقی را از نظر ساختاری و فیزیکو شیمیایی بررسی کرد. به‌طورکلی سازه طراحی شده دارای ساختار مطلوب فیزیکو شیمیایی است و از جهت حلالیت و تاخوردگی مناسب می‌تواند در تولید باکتربوسین در شرایط آزمایشگاهی کمک کننده باشد.



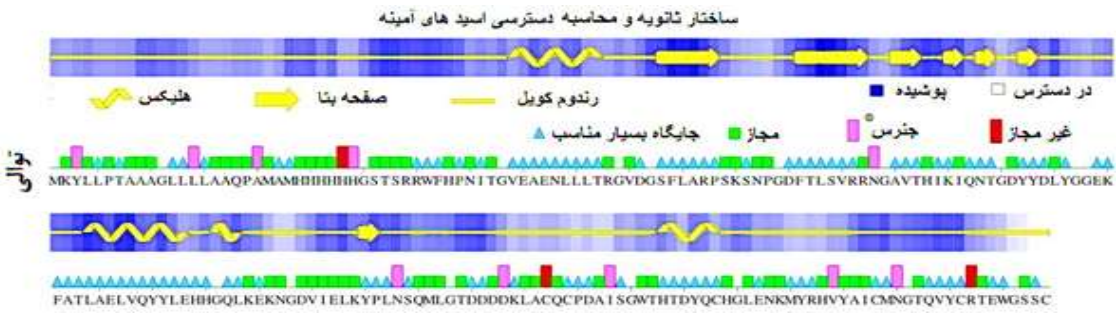
شکل ۱: ساختار دوم پروتئین الحاقی N-SH۲-LTS



شکل ۲: ساختار دوم دمین N-SH۲

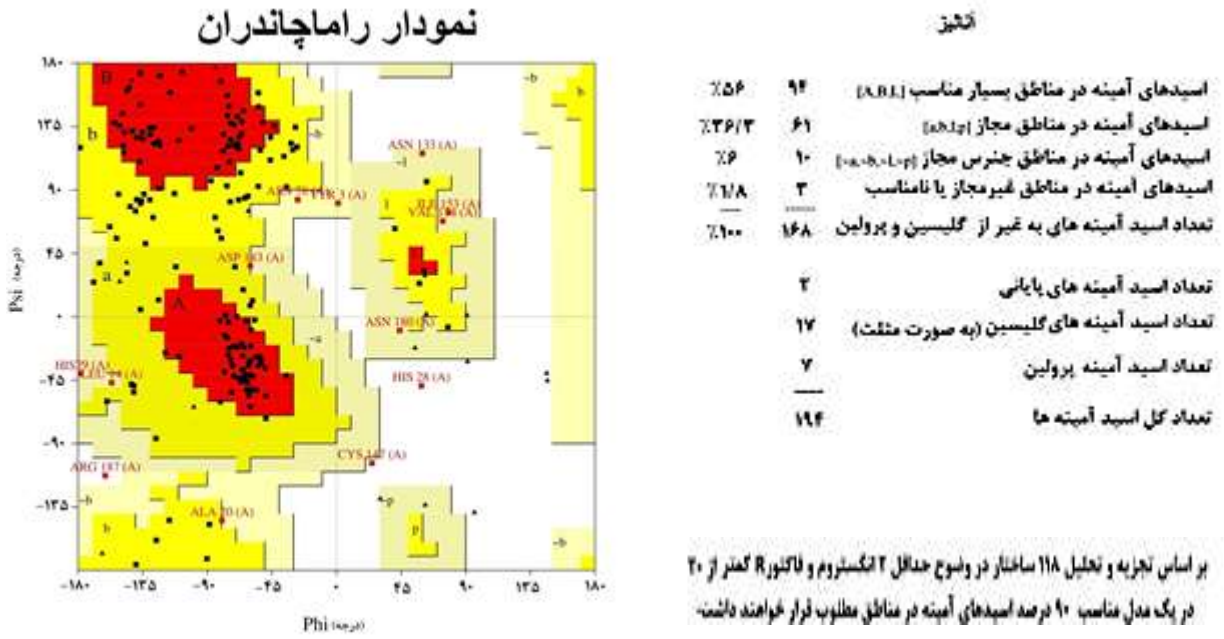


شکل ۳: آنالیز ساختاری پروتئین N-SH۲-LTS، قرمز: N-SH۲ ،آبی: لاتروسپورولین ، سبز: جایگاه برش انتروکیناز

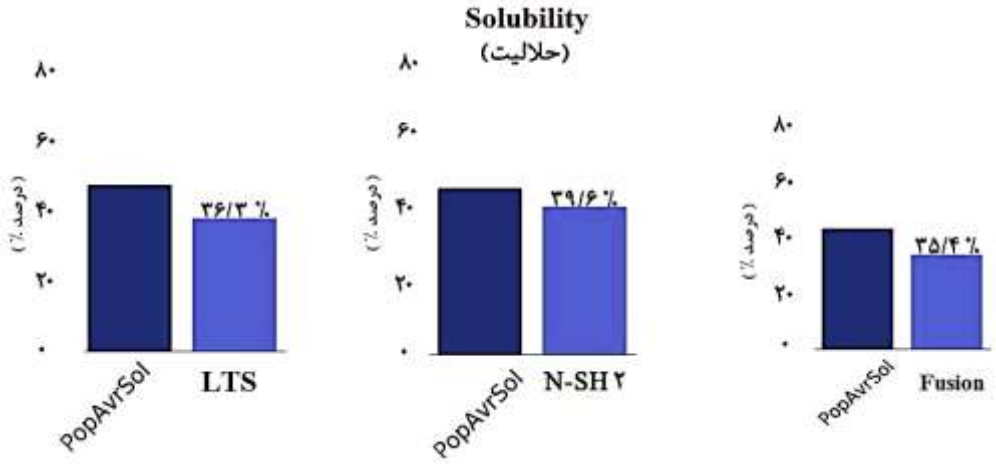


شکل ۴: دسترس بودن اسیدهای آمینه پروتئین الحاقی N-SH۲-LTS (کیفیت استریو شیمیایی)

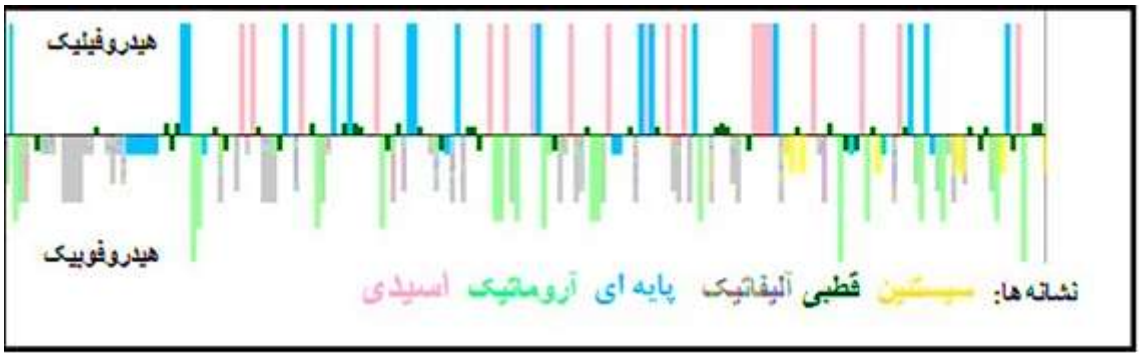
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264



شکل ۵: نمودار راماچاندران جهت برآورد کیفیت مدل ارائه شده

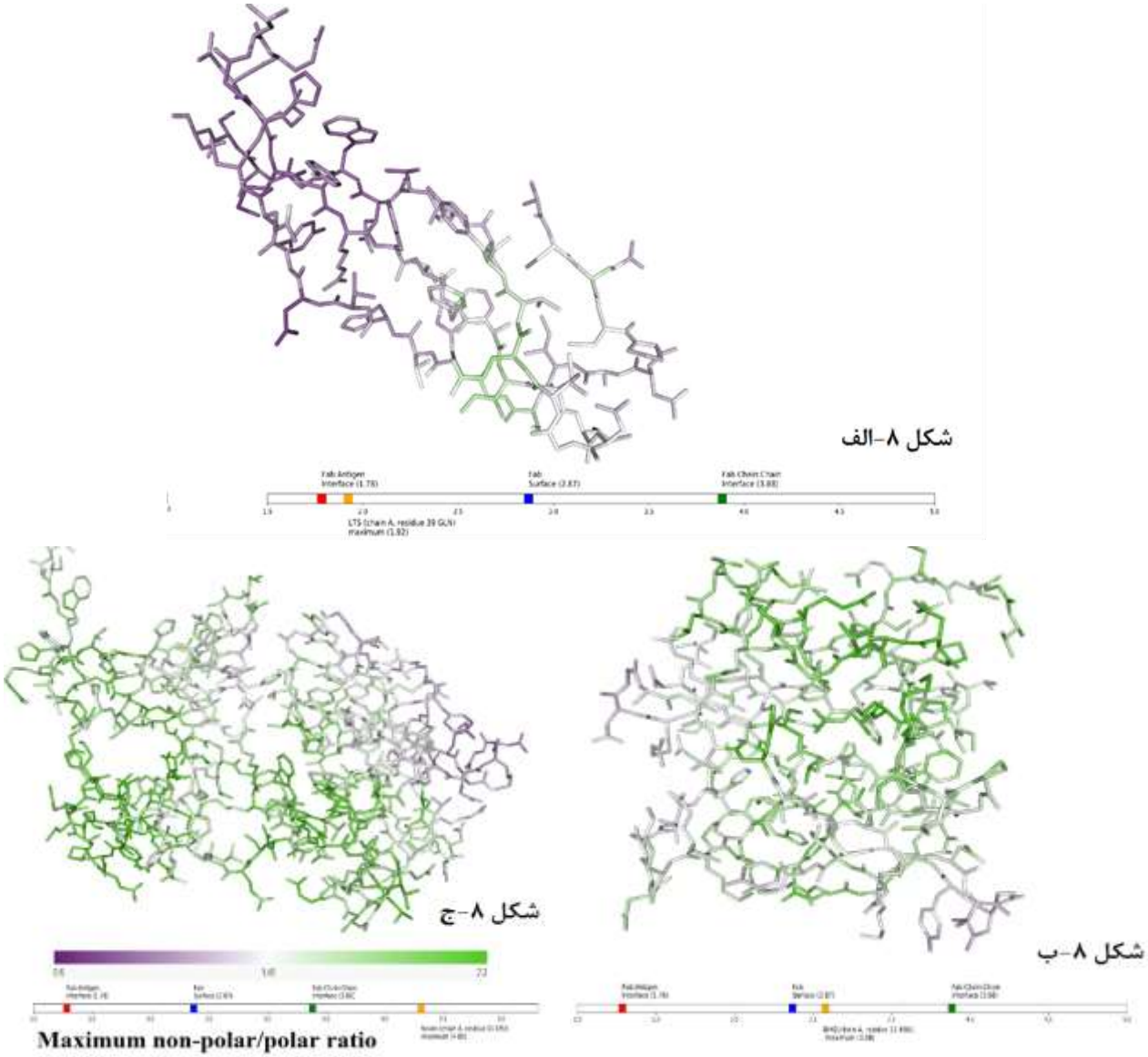


شکل ۶: برآورد میزان حلالیت پپتید لاتروسپورولین، N-SH۲ و پروتئین الحاقی توسط نرم‌افزار Pro-Sol
(هر پپتید با میزان حلالیت مناسب رفرانس مقایسه شده است)



شکل ۷: مناطق آب‌دوست و آب‌گریز در طول توالی پپتید توسط نرم‌افزار PepCalc به تصویر کشیده شده است.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264



شکل ۸: تصویر نسبت نواحی قطبی به نواحی غیرقطبی سه حالت مختلف (۸-الف: لاتروسپورولین، ۸-ب: N-SH۲ و۸-ج: پروتئین الحاقی) که مناطق آب‌گریز در ساختار آن‌ها توسط رنگ سبز مشخص شده‌اند. لاتروسپورولین دارای آب‌گریزی کم‌تری است درحالی‌که N-SH۲ آب‌گریزی بیش‌تری دارد.

بحث

با توجه به اهمیت جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و لزوم مقابله با عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، پپتیدهای ضدمیکروبی بالاخص باکتریوسین‌ها، مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. با توجه به تولید مقدار کم باکتریوسین از باکتری مولد و خالص‌سازی آن‌ها با هزینه‌های بالا، نظر محققین به سمت تولید باکتریوسین‌های نوترکیب جلب شده است. به‌منظور جلوگیری از اثر سمی پپتید بر میزبان و تاخوردگی صحیح آن لازم است در طراحی سازه ژنی باکتریوسین‌ها، ژن پروتئین کمکی به ژن باکتریوسین متصل شود و یک پروتئین نوترکیب ساخت (Parachin و همکاران، ۲۰۱۲). از رایج‌ترین پروتئین‌های متصل شونده می‌توان به GST (Sun و همکاران، ۲۰۱۲)، SUMO (Li و همکاران، ۲۰۱۱)، GFP (Skosyrev و همکاران، ۲۰۰۳)، TRX (Xu و همکاران، ۲۰۰۷) اشاره نمود. راهکارهای متفاوتی ازجمله استفاده از چاپرون‌ها (پروتئین کمکی) و فولدازها به‌عنوان پروتئین متصل شونده، می‌توانند به افزایش بازدهی تولید پروتئین نوترکیب کمک کنند، با این‌وجود تولید فرم محلول هنوز مشکل جدی به‌نظر می‌رسد (Terpe، ۲۰۰۶؛ Demain و همکاران، ۲۰۰۹؛ Jana و همکاران،

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

۲۰۰۵). هدف از انجام این مطالعه طراحی سازه ژنی ترکیبی برای پروتئین N-SH۲-LTS با کمک دمین N-SH۲ و معرفی آن به‌عنوان یک گزینه پپتید کمکی بوده است.هم‌چنین، بررسی بیوانفورماتیکی پیش‌ساز پروتئینی جهت تعیین ویژگی‌های ساختاری، خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی، حلالیت و سطوح آب‌گریز آن بوده است. Dyson و همکارانش (۲۰۰۴) در مطالعه خود به این نکته اشاره کردند که اتصال پروتئین‌های کمکی در قسمت آمینی ژن موثرتر از قسمت کربوکسیلی ژن عمل می‌کند. بنابراین دمین N-SH۲ در قسمت آمینی توالی ژن لاتروسپورولین برای طراحی این سازه به‌کار گرفته شد. چاپرون‌ها با اتصال به نواحی آب‌گریز سطح پروتئین‌های تا نخورده و تا خورده ناقص، مانع از ایجاد پیوند آب‌گریز- آب‌گریز سریع تصادفی می‌شوند و از تجمع (Protein aggregation) پروتئین‌ها و ایجاد رسوب جلوگیری می‌نمایند. گرچه تولید فرم نامحلول در ابتدا در سیتوپلاسم می‌تواند به‌واسطه عدم ایجاد سمیت در سلول میزبان مفید باشد ولی حضور پپتید کمکی به تا خوردگی صحیح پس از خالص‌سازی و در شرایط آزمایشگاه کمک می‌نماید و با ایجاد شرایط واکنش اکسیداسیون- احیا سیستئین‌های ساختار،مانع به‌هم‌ریختگی غیرقابل برگشت پروتئین و ایجاد پیوندهای دی سولفیدی و فرم محلول پروتئین می‌شوند (Kolaj و همکاران، ۲۰۰۹) با توجه به داده-های بیوانفورماتیکی در مقایسه سطوح آب گریز پروتئین الحاقی و لاتروسپورولین استنباط می‌شود که دمین N-SH۲ یک ملکولی با سطوح کاملاً آب‌گریز است و می‌تواند به‌عنوان یک چاپرون عمل کند و مانع از رسوب و مجتمع شدن پپتیدها شود. هم‌چنین، قرار دادن جایگاه برش انتروکیناز به‌عنوان یک قطعه قابل انعطاف ما بین دمین N-SH۲ و توالی لاتروسپورولین، باعث می‌شود پپتید بتواند به‌راحتی بچرخد و فرآیند تا خوردگی به آرامی انجام شود. نکته‌ای که در انتخاب دمین N-SH۲ به‌عنوان قطعه پپتیدی کمکی مورد توجه است این است که در توالی ژنی طراحی شده یک سیستئین با اسیدآمینه آلانین جایگزین گردیده و فرم فاقد سیستئین حاصل گردیده است (Fairlieو همکاران، ۲۰۰۲) و از آن‌جایی‌که پپتید لاتروسپورولین دارای ۶ اسیدآمینه سیستئین و سه پیوند دی‌سولفیدی می‌باشد (Singh و همکاران، ۲۰۱۵)، هیچ پیوند دی‌سولفیدی خارجی بین قطعه پپتیدی کمکی و پپتید ایجاد نمی‌شود و اختلالی در تاخوردگی پپتید به‌وجود نمی‌آید. در مطالعه Fox و همکاران (۲۰۰۱)، وجود سطوح آب‌گریز وسیع بر روی پروتئین MBP(Maltose-binding protein) را علت خاصیت چاپرونی و تسهیل‌کننده تاخوردگی صحیح پروتئین‌های متصل‌شده به MBP دانستند. پروتئین‌های کمکی یا چاپرون‌ها می‌توانند میزان بیان، حلالیت، تاخوردگی و خالص‌سازی پروتئین را بهبود بخشند (Malhotra، ۲۰۰۹). میزان حلالیت پروتئین الحاقی در مقایسه با بیان ژن به تنهایی گاهاً کم‌تر است که این امر به‌خصوصیات‌فیزیکی پروتئین متصل‌شده به‌عنوان چاپرون یا کمکی بستگی دارد. اگر پروتئین کمکی حلالیت بالا و خاصیت تاخوردگی ذاتی داشته‌باشد می‌تواند به حلالیت کل پروتئین الحاقی که از طریق حفظ پروتئین‌های تاخورده حد واسط تا رسیدن به ساختار نهایی خود، کمک شایانی کند (McCoy و همکاران، ۱۹۹۷). آنالیز اطلاعات بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که دمین N-SH۲ از حلالیت نسبی قابل قبولی برخوردار است. بنابراین این دمین اثر مثبتی بر حلالیت پروتئین الحاقی گذاشته و اختلالی در حلالیت آن ایجاد نمی‌کند. آنالیزهای انجام شده نشان داد امکان بیان پروتئین الحاقی با تاخوردگی مناسب در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد. در این شرایط پیش‌ساز پروتئینی بیان شده احتمالاً سمیتی بر سلول میزبان نداشته است.هم‌چنین،پیش‌بینی سازه‌ژنی نشان داد که ویژگی‌های ساختاری و خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی سازه ژنی در حدمطلوب می‌باشد.حضور N-SH۲ ممکن‌است‌در تاخوردگی، حلالیت، بیان و خالص‌سازی باکتریوسین مدنظر نقش مثبتی داشته باشد.

منابع

1. **Ahmad, S.; Banville, D.; Zhao, Z.; Fischer, E.H. and Shen, S.H., 1993.** A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 90, No. 6, pp: 2197-2201.
2. **Chatterjee, D.K. and Esposito, D., 2006.** Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. Protein expression and purification. Vol. 46, No. 1, pp: 122-129.
3. **Cotter, P.D.; Hill, C. and Ross, R.P., 2005.** Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology. Vol. 3, No. 10, pp: 777.
4. **Demain, A.L. and Vaishnav, P., 2009.** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology advances. Vol. 27, No. 3, pp: 297-306.
5. **Dyson, M.R.; Shadbolt, S.P.; Vincent, K.J.; Perera, R.L. and McCafferty, J., 2004.** Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression. BMC biotechnology. Vol. 4, No. 1, pp: 32.
6. **Esposito, D. and Chatterjee, D.K., 2006.** Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. Current opinion in biotechnology. Vol. 17,No. 4,pp:353-358.
7. **Fairlie, W.D.; Uboldi, A.D.; De Souza, D.P.; Hemmings, G.J.; Nicola, N.A. and Baca, M., 2002.** A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide containing peptides. Protein expression and purification. Vol. 26, No. 1, pp: 171-178.
8. **Fimland, G.; Blingsmo, O.R.; Sletten, K.; Jung, G.; Nes, I.F. and Nissen-Meyer, J., 1996.** New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: The C-terminal region is important for determining specificity. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 62, No. 9, pp: 3313-3318.
9. **Fontana, M.B.C.; de Bastos, M.D.C.F. and Brandelli, A., 2006.** Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit Staphylococcus epidermidis adhesion to catheters. Current microbiology. Vol. 52, No. 5, pp: 350-353.
10. **Fox, J.D.; Kapust, R.B. and Waugh, D.S., 2001.** Single amino acid substitutions on the surface of Escherichia coli maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. Protein Science. Vol. 10, No. 3, pp: 622-630.
11. **Guyonnet, D.; Fremaux, C.; Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J. M., 2000.** Method for rapid purification of class

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

expression in Escherichia coli with the highest return of investment. Protein expression and purification. Vol. 81, No. 1, pp: 33-41.

32. **Parachin, N.S.; Mulder, K.C.; Viana, A.A.B.; Dias, S.C. and Franco, O.L., 2012.** Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. Peptides. Vol. 38, No. 2, pp: 446-456.
33. **Pawson, T., 2004.** Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. Cell. Vol. 116, No. 2, pp: 191-203.
34. **Riley, M.A.; Goldstone, C.M.; Wertz, J.E. and Gordon, D., 2003.** A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. Journal of evolutionary biology. Vol. 16, No. 4, pp: 690-697.
35. **Riley, M.A., 1998.** Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annual review of genetics. Vol. 32, No. 1, pp: 255-278.
36. **Singh, P.K.; Sharma, V.; Patil, P.B. and Korpole, S., 2012.** Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by Brevibacillus sp. strain GI-9. PloS one. Vol. 7, No. 3, pp: e31498.
37. **Singh, P.K.; Solanki, V.; Sharma, S.; Thakur, K.G.; Krishnan, B. and Korpole, S., 2015.** The intramolecular disulfide-stapled structure of laterosporulin, a class IId bacteriocin, conceals a human defensin-like structural module. The FEBS journal. Vol. 282, No. 2, pp: 203-214.
38. **Skosyrev, V.S.; Kulesskiy, E.A.; Yakhnin, A.V.; Temirov, Y.V. and Vinokurov, L.M., 2003.** Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in Escherichia coli cells. Protein expression and purification. Vol. 28, No. 2, pp: 350-356.
39. **Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K., 2005.** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. Microbial cell factories. Vol. 4, No. 1,pp: 1.
40. **Sun, Y.; Li, Q.; Li, Z.; Zhang, Y.; Zhao, J. and Wang, L., 2012.** Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of palustrin-2CE, an antimicrobial peptide of Rana chensinensis. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. Vol. 76, No. 1, pp: 157-162.
41. **Svetoch, E.A.; Stern, N.J.; Eruslanov, B.V.; Kovalev, Y.N.; Volodina, L.I.; Perelygin, V.V. and Levchuk, V.P., 2005.** Isolation of Bacillus circulans and Paenibacillus polymyxa strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. Journal of food protection. Vol. 68, No. 1, pp: 11-17.
42. **Terpe, K., 2006.** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 72, No. 2, pp: 211-222.
43. **Tagg, J.R.; Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W., 1976.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriological reviews. Vol. 40, No. 3, pp: 722-729.
44. **Wang, Y.; Henz, M.E.; Fregeau Gallagher, N.L.; Chai, S.; Gibbs, A.C.; Yan, L.Z. and Vederas, J.C., 1999.** Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. Biochemistry. Vol. 38, No. 47, pp: 15438-15447.
45. **Xu, X.; Jin, F.; Yu, X.; Ren, S.; Hu, J. and Zhang, W., 2007.** High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA (1-8)–magainin2 (1-12) with an ubiquitin fusion partner in Escherichia coli. Protein expression and purification. Vol. 55, No. 1, pp: 175-182.

IIa bacteriocins and comparison of their activities. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 66, No. 4, pp: 1744-1748.

12. **Hebditch, M.; Carballo-Amador, M.A.; Charonis, S.; Curtis, R. and Warwicker, J., 2017.** Protein–Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. Bioinformatics. Vol. 33, No. 1), pp: 3098-3100.
13. **Hebditch, M. and Warwicker, J., 2019.** Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics. Scientific reports. Vol. 9, No. 1, pp: 1969.
14. **Jack, R.W.; Tagg, J.R. and Ray, B., 1995.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 59, No. 2, pp: 171-200.
15. **James, R.; Lazdunski, C. and Pattus, F., 2013.** Bacteriocins, microcins and lantibiotics (Vol. 65). Springer Science & Business Media.
16. **Jana, S. and Deb, J.K., 2005.** Retracted Article: Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 67, No. 3, pp: 289-298.
17. **Kleerebezem, M.; Beerthuyzen, M.M.; Vaughan, E.E.; De Vos, W.M. and Kuipers, O.P., 1997.** Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin inducible expression cassettes for Lactococcus, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* sp. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63, No. 11, pp: 4581-4584
18. **Kolaj, O.; Spada, S.; Robin, S. and Wall, J.G., 2009.** Use of folding modulators to improve heterologous protein production in Escherichia coli. Microbial cell factories. Vol. 8, No. 1, pp: 9.
19. **Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. and Thornton, J.M., 1993.** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of applied crystallography. Vol. 26, No. 2, pp: 283-291.
20. **Li, C.; Haug, T.; Styrvold, O.B.; Jørgensen, T.Ø. and Stensvåg, K., 2008.** Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 32, No. 12, pp: 1430-1440.
21. **Li, J.F.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Kang, C.T. and Zhang, S. Q., 2011.** SUMO mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from two joined genes in Escherichia coli. Current microbiology. Vol. 62, No. 1, pp: 296-300.
22. **Malhotra, A., 2009.** Tagging for protein expression. In Methods in enzymology. Vol. 463, pp: 239-258.
23. **Mayer, B.J., 2017.** What Have We Learned from SH2 Domains? In SH2 Domains. Humana Press, New York, NY. pp: 37-43.
24. **McAuliffe, O.; Ross, R.P. and Hill, C., 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS microbiology reviews. Vol. 25, No. 3, pp: 285-308.
25. **McCoy, J. and La Ville, E., 1997.** Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. Current protocols in protein science. Vol. 10, No. 1, pp: 6-7.
26. **Miller, K.W.; Schamber, R.; Osmanagaoglu, O. and Ray, B., 1998.** Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 64, No. 6, pp: 1997-2005.
27. **Mohammad, N.; Karsabet, M.T.; Amani, J.; Ardjmand, A.; Zadeh, M.R.; Gholi, M.K. and Ghasemi, A., 2016.** In silico design of a chimeric protein containing antigenic fragments of Helicobacter pylori; a bioinformatic approach. The open microbiology journal. Vol. 10, pp: 97.
28. **Morris, A.L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G. and Thornton, J.M., 1992.** Stereochemical quality of protein structure coordinates. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. Vol. 12, No. 4, pp: 345-364.
29. **Nascimento, J.S.; Ceotto, H.; Nascimento, S.B.; Giambiagi-deMarval, M.; Santos, K.R.N. and Bastos, M.C.F., 2006.** Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. Letters in applied microbiology. Vol. 42, No. 3, pp: 215-221.
30. **Niwa, T.; Ying, B.W.; Saito, K.; Jin, W.; Takada, S.; Ueda, T. and Taguchi, H., 2009.** Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 106, No. 11, pp: 4201-4206.
31. **Pacheco, B.; Crombet, L.; Loppnau, P. and Cossar, D., 2012.** A screening strategy for heterologous protein

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131264

Design of a fusion gene construct for production of recombinant laterosporulin bacteriocin and bioinformatic analysis for assessing the role of the amino-terminal SH2 domain

- **Simin Salehzadeh:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Mohammad Tabatabaei*:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Abdollah Derakhshandeh:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Hamid Reza Karbalaei Heidary:** Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: November 2019 Accepted: January 2020

Key words: Laterosporulin, amino-terminal SH2, Recombinant Production, Bioinformatics

Abstract

Bacteriocins are peptides produced by bacteria that are known for their antimicrobial activity against bacteria and fungi. Some chaperone peptides can be probably applied to neutralize the toxic effect of the peptide and produce a soluble form of the protein, as well as to provide high amounts of bacteriocin using recombinant DNA technology. Laterosporulin is described as a 49 amino acid bacteriocin that is naturally secreted from *Brevibacillus laterosporus* GI-9. In the present study, for the first time, the amine region of the SH2 protein was used to construct a fusion protein for the production of recombinant laterosporulin. In the current study, a fusion gene construct was designed containing the histidine sequence, the SH2 domain, the enterokinase cleavage site, and the laterosporulin peptide. The findings demonstrated that N-SH2 with suitable hydrophobic surfaces can be capable of preventing the aggregation and irreversible structural disruption of bacteriocin laterosporulin as a suitable chaperone. Furthermore, our analysis raised the possibility that target peptide can be expressed with appropriate folding in vitro. The present study revealed that the N-SH2 peptide region could be considered as a suitable alternative for the production of recombinant bacteriocins in *Escherichia coli*.

* Corresponding Author's email: mtabatabaei2003@yahoo.co.uk