مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤١/هفته‌ی اول مهر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۴

کلون، بیان و تخلیص پروتئین ضد میکروبی LL-37 و بررسی اثر آن بر Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو

احسان زارعی مهرورز[۱]، احسان‌اله غزنوی‌راد[۲]، شهره فهیمی‌راد[۳]، حمید ابطحی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاومت به آنتی‌بیوتیک، یک معضل جهانی است. یکی از راه‌های مقابله با این معضل، تولید داروهای جایگزین می‌باشد. در همین راستا، امروزه تحقیقات گسترده‌ای پیرامون پپتیدهای ضد میکروبی علیه عوامل بیماری‌زا در حال انجام است. یکی از این پپتیدها، LL-37 می‌باشد که از نظر بار کاتیونیک و دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد سرطان می‌باشد. از این رو، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید LL-37 بر روی Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو بود.

روش‌ها: ابتدا، ژن LL-37 به وکتور pET-32a متصل گردید. سپس، DNA نوترکیب ایجاد شده، جهت تولید پروتئین به درون باکتری میزبان ترانسفورم شد. پس از تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب، جهت فعال شدن پروتئین، دیالیز در بافر Phosphate buffered saline (PBS) انجام شد. سپس، کارایی پپتید LL-37 بر روی باکتری Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو با استفاده از روش‌های رایج آزمایشگاهی مانند Minimum inhibitory concentration (MIC)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان MIC برای پروتئین LL-37 بر روی باکتری Acinetobacter baumannii ATCC 19606، ۱/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. همچنین، یافته‌های حاصل از آزمایش سنجش اکتیویته‌ی پروتئین، حاکی از آن بود که پروتئین نوترکیب تولید شده، می‌تواند منجر به مهار رشد و از بین رفتن باکتری گردد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، پروتئین LL-37 در مقایسه با سایر پپتیدها و داروها در دیگر مطالعات، از کارایی بالاتری برخوردار می‌باشد؛ به طوری که در غلظت‌های خیلی پایین، باعث نابودی باکتری می‌گردد که نویدبخش آینده‌ای روشن برای درمان عفونت‌های ناشی از Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو است.

واژگان کلیدی: پپتید ضد میکروبی LL-37، مقاومت به داروی آنتی‌بیوتیک، Acinetobacter baumannii

ارجاع: زارعی مهرورز احسان، غزنوی‌راد احسان‌اله، فهیمی‌راد شهره، ابطحی حمید. **کلون، بیان و تخلیص پروتئین ضد میکروبی LL-37 و بررسی اثر آن بر Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۱): ۹۶۰-۹۵۴

مقدمه

مقاومت به آنتی‌بیوتیک، یک معضل جهانی است. هر ساله در آمریکا حدود ۲۳۰۰۰ نفر بر اثر ابتلا به عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جان خود را از دست می‌دهند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک، هر ساله هزینه‌های سنگینی (۳۵-۲۰ میلیارد دلار) را بر اقتصاد ایالات متحده‌ی امریکا تحمیل می‌کند (۱). در میان عوامل بیماری‌زا، مقاومت به آنتی‌بیوتیک باکتری Acinetobacter به علت شیوع آن از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. Acinetobacter، توانایی زیادی برای توسعه‌ی سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد که منجر به مقاومت چند دارویی شده است (۲). Acinetobacter، یک باکتری فرصت‌طلب است که در افراد با نقص ایمنی بستری در محیط‌های بیمارستانی به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU)، سوختگی و جراحی، عفونت‌های شدید ایجاد می‌کند (۳). مهم‌ترین سویه‌ی Acinetobacter همان Acinetobacter baumannii می‌باشد که به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در مراکز بهداشتی- درمانی از آن نام برده می‌شود (۴).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: حمید ابطحی
Email: abtahi@arakmu.ac.ir

یکی از راه‌کارهای مبارزه با روند رو به رشد مقاومت عوامل بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک که توسط سازمان جهانی بهداشت توصیه شده است، توسعه‌ی سرمایه‌گذاری پایدار کشورها در زمینه‌ی پژوهش و تولید داروها و واکسن‌های جدید می‌باشد (۵). به نظر می‌رسد که یکی از جایگزین‌های مناسب، استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی علیه عوامل بیماری‌زا می‌باشد. پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides یا AMPs)، دارای دامنه‌ی فعالیت ضد باکتریایی، ویروسی و قارچی هستند که از حیوانات و گیاهان منشأ می‌گیرند. AMPs به علت دامنه‌ی گسترده‌ی فعالیت‌ها، سمیت کمتر و کاهش مقاومت عوامل میکروبی نسبت به آن‌ها، آینده‌ی امیدوار کننده‌ای را در پیش دارند (۶). بیشتر این پپتیدها، کاتیونیک هستند که همراه با خاصیت آمفی‌پاتیک به آن‌ها این توانایی را می‌دهد که با غشای سلولی واکنش دهند (۷). پپتیدهای ضد میکروبی به طور معمول کمتر از ۱۰۰ اسیدآمینه دارند (۸). بیش از ۲۳۰۰ پپتید ضد میکروبی در پایگاه Antimicrobial peptide database (APD) گردآوری شده است (۱۰-۹). از جمله پپتیدهای ضد میکروبی که در انسان تولید می‌گردد، می‌توان به Cathelicidins، Thrombocidin و Defensins اشاره کرد.

Cathelicidins پپتیدی است که توسط سیستم ایمنی (ذاتی) عرضه می‌گردد (۱۱). پپتید ضد میکروبی LL-37 یکی از پپتیدهایی است که از پروتئین Cathelicidin انسانی مشتق شده است و از نظر ساختاری کاتیونیک، آمفی‌پاتیک و α- هلیکال می‌باشد. پپتید LL-37، از ۳۷ اسیدآمینه تشکیل شده است که وزنی بین ۵-۴ کیلودالتون دارد. پپتید LL-37 از مایعات داخل بدن و سلول‌های مختلفی مانند ماست‌سل‌ها، سلول‌های Natural killer (NK)، سلول‌های B و نوتروفیل‌های نابالغ منشأ می‌گیرد؛ به طوری که باعث از بین رفتن عوامل بیماری‌زای باکتریایی، ویروسی و قارچی می‌گردد (۱۳-۱۲). پپتید LL-37، علاوه بر فعالیت ضد میکروبی، در فرایندهای التهاب، آنژیوژنز و بهبود زخم نقش دارد؛ همچنین، به عنوان ادجوانت نیز عمل می‌کند (۱۴). پپتید LL-37 از طریق تخریب غشای سلولی و اتصال به DNA باکتری، منجر به مرگ باکتری می‌گردد (۱۵).

با توجه به اهمیت موضوع و نیز با توجه به راه‌کار توصیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت جهت مبارزه با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، هدف از انجام این مطالعه، تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب LL-37 و بررسی اثر آن در شرایط In vitro بود که در آن سعی شد با بررسی کارایی پروتئین نوترکیب تولید شده بر روی باکتری Acinetobacter baumannii ATCC 19606 به کمک روش‌های رایج در شرایط آزمایشگاهی، گامی در راستای تهیه‌ی داروهای جدید جهت درمان عفونت‌های بیمارستانی برداشت.

روش‌ها

کلونینگ: ابتدا ژن LL-37 (Biomatik, Canada) خریداری گردید. در ژن سنتز شده، جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودالاثر BamH1 و Xho1 به منظور ایجاد دو انتهای چسبنده جهت اتصال به پلاسمید pET-32a (DNA نوترکیب) پیش‌بینی شد. برش آنزیمی پلاسمید pET32a و ژن LL-37 سنتز شده با آنزیم‌های BamHI و XhoI (Fermantas, Lithuania) انجام گردید.

در مرحله‌ی بعد، واکنش الحاق بین ناقل پلاسمیدی pET-32a و قطعه‌ی ژنی برش خورده در حرارت ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به منظور تولید پلاسمید نوترکیب یا همان لیگیشن (LL-37+pET-32a) با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermantas, Lithuania) انجام شد. سپس، DNA نوترکیب ساخته شده به میزبان باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) با روش ترانسفورماسیون (Transformation) جهت بیان ژن انتقال یافت. جهت تأیید وجود باکتری‌های دریافت کننده‌ی DNA نوترکیب، از روش‌های Polymerase chain reaction (PCR) و تخلیص پلاسمید DNA نوترکیب به روش Mini-preparation استفاده شد (۳۲).

القای بیان پروتئین در میزبان باکتری، با استفاده از Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermantas, Lithuania) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار صورت گرفت. جهت تایید نتیجه‌ی القای پروتئین، از روش Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده گردید که در این مطالعه، جهت تأیید پروتئین نوترکیب تولید شده با شاهد منفی (پلاسمید pET-32a بدون ژن) و شاهد مثبت (پلاسمید pET-32a با ژن غیر از LL-37) مقایسه گردید. پروتئین تولید شده، با استفاده از کیت Ni-NTA (Qiagen, USA) و طبق دستورالعمل خود کیت تخلیص شد (۱۷-۱۶).

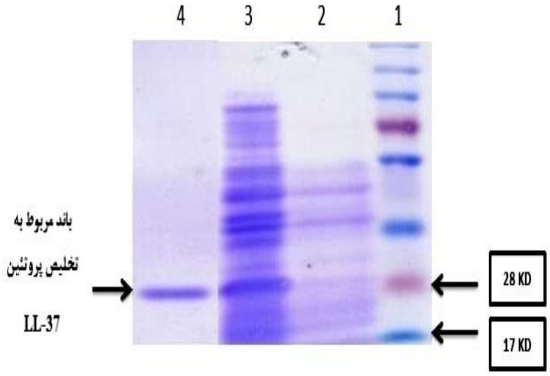
جهت دستیابی به محلول پروتئینی فاقد اوره و فعال کردن پروتئین، از روش دیالیز با بافر Phosphate buffered saline (PBS) در pH خنثی استفاده گردید (۱۸). سپس، به منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین LL-37 تولید شده، از دستگاه اسپکتروفتومتری (Eppendorf, Germany) استفاده شد. در نهایت، برای ارزیابی اثربخشی پروتئین دیالیز شده بر روی باکتری Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو (Multiple drug resistant یا MDR) ATCC19606 (انستیتو پاستور، ایران) در شرایط In vitro (برون‌تنی) روش‌های Minimum inhibitory concentration (MIC) و سنجش اکتیویته‌ی پروتئین انجام شد.

آزمون تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC): جهت سنجش کارایی پروتئین نوترکیب تولید شده بر روی Acinetobacter baumannii ATCC 19606 در شرایط آزمایشگاهی از روش MIC استفاده گردید. ابتدا باکتری Acinetobacter baumannii ATCC 19606 در محیط استریل Brain heart infusion (BHI Broth) (Merck, Germany) کشت داده شد. سپس، به صورت منظم، جذب نوری (Optical density یا OD) از کشت باکتری تهیه گردید و زمانی که OD به McFarland ۰/۵ رسید، رقت ۱ به ۱۰۰ از باکتری (جهت دستیابی به 10^6 واحد تشکیل دهنده‌ی کلونی/میلی‌لیتر باکتری) در محیط کشت Muller-Hinton broth (MHB) (Merck, Germany) تهیه گردید. پس از رقیق‌سازی، مراحل آزمایش MIC در شرایط استریل انجام شد. ابتدا، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت MHB به داخل چاهک‌های شماره‌ی ۱۰-۱ هر ردیف پلیت ریخته شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر پروتئین دیالیز شده با غلظت‌های مختلف (۴۰۰-۱/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید. در چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ هر ردیف به ترتیب، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری رقیق شده به عنوان شاهد مثبت و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت استریل MHB به عنوان شاهد منفی اضافه شد (۲۱-۱۹). لازم به ذکر است که این آزمایش به صورت سه تایی (Triplicate) انجام شد.

آزمایش سنجش اکتیویته‌ی پروتئین نوترکیب: ابتدا باکتری Acinetobacter baumannii به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد و پس از سانتریفیوژ (۵۳۲۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه)، مایع رویی دور ریخته و رسوب باقی مانده شستشو شد. برای شستشو، به رسوب باکتری ۵ سی‌سی بافر PBS استریل اضافه گردید. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه بر روی Shaker قرار داده شد تا به خوبی رسوب در بافر حل شود. پس از سانتریفیوژ (۵۳۲۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه)، مایع رویی دور ریخته شد. به همین ترتیب، شستشو سه مرتبه تکرار شد. پس از شستشو، ۱ سی‌سی از محیط کشت MHB به رسوب باکتری اضافه گردید. برای تعیین غلظت باکتری، OD باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. پس از رسیدن OD سوسپانسیون باکتری به ۰/۵۵، آزمایش‌های مربوط به مقاومت دارویی انجام گردید. در این آزمایش، شاهد (سوسپانسیون باکتری بدون پروتئین) و نمونه (سوسپانسیون باکتری همراه با پروتئین) تهیه شد. غلظت پروتئین استفاده شده برای آزمایش اکتیویته، ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. حجم نهایی هر میکروتیوب حاوی سوسپانسیون باکتری برابر ۵۰۰ میکرولیتر بود. نمونه‌ها جهت انکوباسیون، داخل دستگاه Termomixer با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب ۴۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در نهایت، OD نمونه‌های مورد و شاهد در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۷ ساعت پس از انکوبه شدن سنجیده شد (۲۳-۲۲).

یافته‌ها

نتایج حاصل از تولید و تخلیص پروتئین: جهت مشاهده‌ی نتایج حاصل از بیان DNA نوترکیب (LL-37 + pET-32a) تولید شده در میزبان Escherichia coli BL21 (DE3) (شکل ۱) پروتئین تولید شده در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت پس از القا (اضافه کردن IPTG) به همراه نمونه‌ی قبل از القا بر روی ژل SDS ۱۲ درصد عمودی اعمال شد. همان‌طور که در شکل ۱ آمده است، باندهای حاصل از القای بیان پروتئین نوترکیب قابل مشاهده می‌باشد که تأیید کننده‌ی تولید پروتئین مورد نظر است. همچنین، نتایج به دست آمده در خصوص القای پلاسمید pET-32a بدون ژن (شاهد منفی) و پلاسمید pET-32a همراه با ژن دیگر غیر از LL-37 (شاهد مثبت) تأییدی بر یافته‌های حاصل از القای پروتئین نوترکیب تولید شده بود. پس از تولید پروتئین، جهت جداسازی پروتئین LL-37 از سایر پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری، از کیت Ni-NTA استفاده گردید (شکل ۱). همان‌طور که در شکل شماره ۱ قابل مشاهده است، پس از تخلیص انجام شده، تنها باند مربوط به پروتئین نوترکیب (۲۷ کیلودالتون) باقی ماند و اثری از سایر پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری میزبان دیده نشد که نشان دهنده‌ی صحیح بودن تخلیص انجام شده می‌باشد.



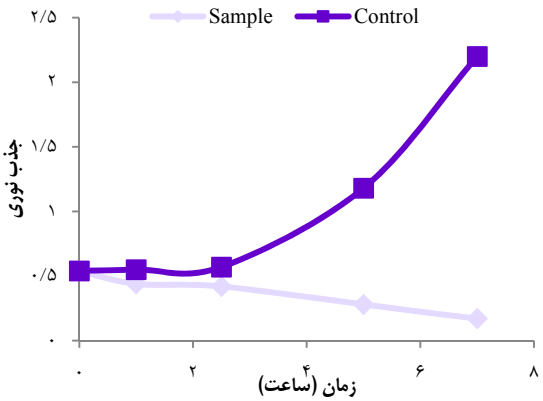
شکل ۱. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین LL-37 بر روی ژل ۱۵ درصد Sodium dodecyl sulfate (SDS)

چاهک ۱: نشانگر پروتئینی، چاهک ۲: قبل از القا با Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)، چاهک ۳: ۲ ساعت پس از القا، چاهک ۴: پروتئین تخلیص شده (با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون)

نتایج حاصل آزمایش‌های برون تنی (In vitro): یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مقدار MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی)

برای پروتئین LL-37 بر روی باکتری Acinetobacter baumannii مقاوم به دارو ۱/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود.

یافته‌های حاصل از آزمایش سنجش اکتیویته‌ی پروتئین نشان داد که پپتید ضد میکروبی LL-37 باعث کاهش رشد باکتری شده است. این در حالی است که رشد باکتری‌ها در نمونه‌ی شاهد رو به افزایش بود. شرح این نتایج در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. نتایج آزمایش سنجش اکتیویته‌ی پروتئین LL-37 بر روی باکتری Acinetobacter baumannii ATCC 19606

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، از روش کلونینگ جهت تولید پپتید LL-37 استفاده شد؛ چرا که سنتز به وسیله‌ی روش‌های نوترکیب مانند روش‌های کلون کردن ژن و بیان ژن در میکروارگانیسم‌ها، امکان تولید یک یا چند پپتید نوترکیب را فراهم می‌کند. پروتئین‌های نوترکیب در بیشتر موارد خواص ساختاری پروتئین طبیعی را دارند. همچنین، می‌توان تولید پروتئین‌هایی را که در حالت طبیعی به میزان اندک صورت می‌گیرد، در حالت نوترکیب به میزان دلخواه افزایش داد. علاوه بر این، خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود (۲۴). همچنین، در این پژوهش باکتری *Escherichia coli* جهت کلون و بیان ژن LL-37 به دلیل سرعت رشد و تکثیر بالا، در دسترس بودن وکتورهای بیانی جهت ایجاد DNA نوترکیب، درصد موفقیت بالاتر در پذیرفتن DNA خارجی نسبت به سایر ارگانیسم‌ها، کم هزینه بودن در مقایسه با سایر ارگانیسم‌ها و کشت آسان انتخاب گردید (۲۶-۲۵).

در این مطالعه، پس از طی مراحل کلونینگ جهت تولید پروتئین Ib-AMP4، فعالیت ضد میکروبی این پروتئین بر روی باکتری Acinetobacter baumannii ATCC19606 به کمک آزمون‌های رایج در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین LL-37 تولید شده در سطح بالایی می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، مقدار MIC می‌باشد که در مقایسه با میزان MIC انواع داروهای ضد میکروبی به کار رفته جهت تخریب Acinetobacter baumannii مقاوم به داروهای مختلف در سایر مطالعات کمتر می‌باشد؛ به طوری که میزان MIC بین ۲۵۶-۳۲ میکروگرم/میلی‌لیتر بود (۲۷).

در مطالعه‌ی Moffatt و همکاران، مشاهده شد که میزان MIC برای Acinetobacter baumannii ATCC 19606 حدود ۱۲۸ میکروگرم/میلی‌لیتر و بالاتر از آن بود (۲۸). مقادیر MIC به دست آمده برای پروتئین ضد میکروبی تولید شده در این مطالعه، در مقایسه با مقادیر MIC برای سایر پپتیدها و داروها در سایر مطالعات مشابه کمتر می‌باشد که نشان دهنده‌ی کارایی بالاتر پروتئین نوترکیب تولید شده، در اثربخشی بر روی باکتری Acinetobacter baumannii می‌باشد. نتایج آزمایش سنجش اکتیویته‌ی پروتئین برای پپتید LL-37 حاکی از آن بود که پپتید نام برده دارای فعالیت ضد میکروبی سریع‌الاثر علیه باکتری Acinetobacter baumannii می‌باشد؛ به طوری که باعث کاهش غلظت باکتری شده است. در حالی که گروه شاهد با رشد باکتری همراه بوده است که این تأیید کننده‌ی قدرت بالای ضد میکروبی پپتید است. در حالی که گروه شاهد، با رشد باکتری همراه بوده که بیانگر قدرت ضد میکروبی فوق‌العاده‌ی پپتید LL-37 است. نتایج حاصل از تحقیق Vila-Farres و همکاران، نشان داد که Mastoparan با غلظت ۸ میلی‌گرم/لیتر طی مدت زمان ۴ ساعت منجر به کاهش تعداد باکتری‌ها گردید. به عبارت دیگر، باعث مهار رشد باکتری Acinetobacter baumannii ATCC 19606 مقاوم به کلیستین شد (۲۹).

نتایج آزمایش‌های MIC و سنجش اکتیویته‌ی پروتئین به طور کامل با یکدیگر هم‌خوانی داشت و نشان دهنده‌ی فعالیت ضد میکروبی قوی و سرعت عمل بالای پپتید نوترکیب LL-37 علیه Acinetobacter baumannii ATCC 19606 بود که نشان دهنده‌ی پتانسیل بالقوه‌ی این پپتید جهت درمان عفونت‌های ناشی از Acinetobacter baumannii ATCC 19606 می‌باشد. امید آن می‌رود که با طی مراحل تکمیلی مانند آزمون‌های درون‌تنی (In vitro)، بتوان به تولید آنتی‌بیوتیک جدیدی جهت کاهش تلفات جانی و مالی که در اثر مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وجود آمده است، نزدیک‌تر شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که با کد

IR.ARAKMU.REC.1395.106 در کمیته‌ی اخلاق ایـن دانشـگاه ثبت شد. از ایـن رو، نویسـندگان از معاونـت تحقیقـات و فـن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و همچنین، تمـامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، مراتب سپاسـگزاری خود را اعلام می‌دارند.

References

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta, GA: CDC; 2013.
2. Zeth K. Structure and mechanism of human antimicrobial peptide dermcidin and its antimicrobial potential. In: Méndez-Vilas A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2013. p. 1333-42.
3. Rivera G, Bulnes J, Castillo C, Ajenjo MC, Garcia P, Labarca J. Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii isolated in a university hospital: Role of inter-hospital transmission. J Infect Dev Ctries 2016; 10(1): 96-9.
4. Spence RP, Towner KJ, Henwood CJ, James D, Woodford N, Livermore DM. Population structure and antibiotic resistance of Acinetobacter DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK. J Med Microbiol 2002; 51(12): 1107-12.
5. Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? Expert Opin Drug Discov 2015; 10(6): 631-50.
6. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol 2011; 29(9): 464-72.
7. Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol 2005; 3(3): 238-50.
8. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 2002; 415(6870): 389-95.
9. Wang Z, Wang G. APD: The Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Res 2004; 32(Database issue): D590-D592.
10. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Res 2009; 37(Database issue): D933-D937.
11. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol 2004; 75(1): 39-48.
12. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood 2000; 96(9): 3086-93.
13. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. Eur J Biochem 1996; 238(2): 325-32.
14. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. Biochem J 1999; 341(Pt 3): 501-13.
15. Wang G, Mishra B, Epand RF, Epand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. Biochim Biophys Acta 2014; 1838(9): 2160-72.
16. Mahmoudi S, Abtahi H, Bahador A, Mosayebi G, Salmanian AH, Teymuri M. Optimizing of Nutrients for High Level Expression of Recombinant Streptokinase Using pET32a Expression System. Maedica (Buchar) 2012; 7(3): 241-6.
17. Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollaee N, Abtahi H. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Lysostaphin From Staphylococcus simulans. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(5): e10009.
18. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, et al. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. J Biol Chem 2000; 275(27): 20374-81.
19. Jorgensen JH, Crawford SA. Assessment of two commercial susceptibility test methods for determination of daptomycin MICs. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2126-9.
20. Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(12): 4528.
21. Koeth LM, DiFranco-Fisher JM, McCurdy S. A Reference Broth Microdilution Method for Dalbavancin In Vitro Susceptibility Testing of Bacteria that Grow Aerobically. J Vis Exp 2015; (103).
22. Satishkumar R, Sankar S, Yurko Y, Lincourt A, Shipp J, Heniford BT, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of lysostaphin-coated hernia repair meshes. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(9): 4379-85.
23. Farhang Nia L, Ghaznavi Rad E, Molaee N, Abtahi H. Cloning, expression and purification of recombinant prolysostaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity. Koomesh 2014; 15 (4): 441-8. [In Persian].
24. Hajikhani B, Najar Peerayeh S, Soleimanjahi H, Hassan ZM. Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from Helicobacter pylori. Modares J Med Sci Pathol 2017; 13(2): 1-10. [In Persian].
25. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009; 27(3): 297-306.

26. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(5): 411-21.
27. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. Curr Eye Res 2005; 30(5): 385-94.
28. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(12): 4971-7.
29. Vila-Farres X, Garcia dlM, Lopez-Rojas R, Pachon J, Giralt E, Vila J. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect 2012; 18(4): 383-7.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.06.2017
Vol. 35, No. 441, 1st Week, October 2017
Accepted: 15.08.2017

Cloning, Expression, and Purification of Antimicrobial Peptide LL-37 and Assessment of its Antimicrobial Effectiveness on Multiple-Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii

Ehsan Zarei-Mehrvarz[1], Ehsanollah Ghaznavi-Rad[2], Shohreh Fahimi-Rad[3], Hamid Abtahi[2]

Original Article

Abstract

Background: Now a day, antibiotic resistance is a global problem. A way to solve this problem is production of alternative drugs. In this regard, today so many researches on antimicrobial peptides against pathogens are being done. LL-37 peptide is one of these peptides that is cationic and has antibacterial, antiviral, and anticancer activity. This project aimed to study the antimicrobial effectiveness of peptide LL-37 on multiple-drug-resistant (MDR) Acinetobacter baumannii.

Methods: First, the LL-37 gene was linked to the pET-32a vector; then, recombinant DNA was transformed into the host bacteria and inducted to produce proteins. After the production and purification of recombinant proteins, to activate the protein, dialysis was performed in phosphate buffered saline (PBS). Then, the efficiency of peptide LL-37 on multiple-drug-resistant Acinetobacter baumannii was tested using common laboratory tests such as minimum inhibitory concentration (MIC).

Findings: The minimum inhibitory concentration of LL-37 on Acinetobacter baumannii ATCC19606 was 1.5 µg/ml. In addition, the activity test showed that the recombinant proteins could inhibit the growth and decay the bacteria.

Conclusion: The results of this study show that LL-37 protein, in comparison to other peptides and drugs in other studies, is more efficient and in low concentration can cause destruction of bacteria. This can herald a bright future for the treatment of infections caused by multiple-drug-resistant Acinetobacter baumannii.

Keywords: LL-37 antibacterial peptide, Antimicrobial drug resistance, Acinetobacter baumannii

Citation: Zarei-Mehrvarz E, Ghaznavi-Rad E, Fahimi-Rad S, Abtahi H. **Cloning, Expression, and Purification of Antimicrobial Peptide LL-37 and Assessment of its Antimicrobial Effectiveness on Multiple-Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(441): 954-60.

1- MSc Student, Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Associate Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Agricultural Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Corresponding Author: Hamid Abtahi, Email: abtahi@arakmu.ac.ir