

بررسی اثر ضد ویروسی پپتید CLF36 و CLFarm بر پروتئین P32 ویروس آبله گوسفندی از طریق شبیه سازی داکینگ مولکولی

• بهزاد محمدنیا

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، ایران

• مجتبی طهمورث پور (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• محمد هادی سخاوتی

گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۱۲-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۲-۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲-۰۲-۱۴ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۱۰-۰۱

Email: m_tahmoorespur@yahoo.com



چکیده

آبله گوسفندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در گوسفندان به شمار می‌رود. در حال حاضر درمان اختصاصی برای این بیماری ویروسی وجود ندارد. هدف از این پژوهش بررسی پپتید ضد میکروبی CLF36 و نوع مهندسی شده این پپتید (CLFarm) بر روی پروتئین سطحی ویروس آبله گوسفندی P32 و رستپورهای سلولی این پروتئین نظیر هپارین سولفات و UDP-N-استیل گلوکز آمین بود. ساختار سوم P32 با استفاده از نرم‌افزارهایی چون I-TASSER انجام شد. برهمکنشها در یک محیط رایانه‌ای ایجاد شده با کمک ابزار بیوانفورماتیک همانند نرم افزارهای HDock به صورت استاتیک و با استفاده از Gromacs در بخش دینامیک مولکولی صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد اسید آمینه‌های پپتید CLF36 درگیر در ایجاد پیوند هیدروژنی با P32 شامل R22، K25، R27، K34 و D1، K5، V8، Q11، K9، R16، R22، K25، R27 و برای CLF36 arm شامل Q31، W30، R27، K13، Q11، K9، K5 و K35 می‌باشد. نتایج داکینگ نشان داد که پپتیدها به سه ناحیه‌ی اپی‌توپی EP1,4,8 در پروتئین P32 متصل شدند. اتصالات هیدروژنی بین CLF36 arm و دو رستپور UDP-N-استیل گلوکز آمین و هپارین سولفات به ترتیب شامل Gln 11، Trp 30 و Arg 27 Cys 33 و Trp 4، Trp 30، Gln 11، Arg 27 Cys 33 بود؛ در حالیکه اتصالات بین CLF36 با این دو رستپور ضعیف گزارش شد. در بخش دینامیک مولکولی، گراف آنالیزهای RMSF و RMSD و Gyrate برای هر دو پپتید نوسانات کمی را نشان دادند که به دلیل جزئی بودن، نادیده گرفته شدند. نهایتاً، نتایج نشان داد که هر دو پپتید عملکرد مناسبی را در مدت زمان 50 نانوثانیه در برابر P32 دارند.

کلمات کلیدی: آبله گوسفندی، CLFarm، CLF36، P32، داکینگ مولکولی

- Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 53-67

Investigating the antiviral effect of CLF36 and CLFarm peptide on P32 protein of sheeppox virus through molecular docking simulation

By: Mohammadniya, B., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Iran. Tahmoorespur, M., (Corresponding Author) Professor of Animal Genetics and Biotechnolog, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Sekhavati, M.H., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Iran.

Received: 2023-02-22 Accepted: 2023-05-04

Revised: 2023-02-22 published: 2023-12-22

Email: m_tahmoorespur@yahoo.com

Sheeppox is one of the most common diseases in sheep that can spread quickly in the herd. Currently, there is no specific treatment for this viral disease. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial peptide CLF36 and CLFarm on the surface protein of the sheep pox virus P32 protein and the cellular receptors of this protein such as heparin sulfate and UDP-N-acetyl glucosamine. The third structure of P32 was done using software such as I-TASSER. The interactions were performed statically in a computer by bioinformatics tools such as HDock software and using Gromacs in the molecular dynamics section. The results of this study showed that the amino acids of CLF36 peptide involved in hydrogen bonding with P32 include D1, K5, V8, Q11, K9, R16, R22, K25, R27 and K34 and for CLFarm include K5, K9, Q11, K13, R27, W30, Q31 and K35. Docking results showed that peptides were attached to three epitope regions EP1,4,8 in P32 protein. In connection with the molecular docking between CLF36 arm and the two receptors UDP-N-acetylglucosamine and heparin sulfate, the hydrogen bonds included Gln 11, Trp 30 and Trp 4, Trp 30, Gln 11, Arg 27, Cys 33, respectively; Although CLF36 had weak binding energy with these two receptors. In the molecular dynamics section, the graph of RMSF and RMSD and Gyrate showed a few fluctuations, which were ignored. Finally, these results showed that both peptides have a good performance against P32 in a period of 50 ns.

Keywords: Sheeppox virus, P32, CLFarm, CLF36, Molecular docking

مقدمه

آبله گوسفند یک بیماری ویروسی عفونی نشخوارکننده کوچک است. این بیماری با شدت متوسط در گله‌های گوسفند در مناطق اندمیک دیده شده اما عموماً در بره و بزغاله که به تازگی به دنیا آمده‌اند کشنده است. همچنین، آبله گوسفند تجارت بین‌المللی را محدود می‌کند و باعث ضررهای اقتصادی می‌شود (۵). از این رو، سازمان جهانی بهداشت حیوانات به دلیل ماهیت شیوع سریع و تأثیر اقتصادی گسترده آن بر صنعت دام، بیماری آبله گوسفندی را به عنوان یک بیماری خطرناک طبقه‌بندی کرده است (۳). این بیماری مسری در حیوان ایجاد تب، پاپول و ندول کرده که در مواردی می‌تواند موجب مرگ دام شود (۲۰). در ایران، پراکندگی این بیماری در مناطق مختلف یکسان نیست. شیوع آبله گوسفندی بیشتر در استان‌های شمال شرقی، شمال غربی و مرکزی گزارش شده است و در استان‌های جنوبی شیوع بیشتری دارد (۹). زیان اقتصادی SPV با کاهش تولید شیر و گوشت گوسفند، کاهش وزن، سقط جنین، آسیب قابل توجه به پشم و پوست، و آسیب‌پذیری در برابر ذات‌الریه و حمله مگس منعکس شده است. اثرات مستقیم اقتصادی این بیماری در درجه اول به دلیل عوارض بیشتر به جای مرگ و میر در حیوانات حساس است. محققین کاهش قابل توجهی در تولید شیر (تا

۳۰٪)، افزایش نرخ مرگ و میر در حیوانات مبتلا به آبله (تا ۹۵٪) (زیادی و همکاران، ۲۰۲۱) و سقط جنین (۹/۶۶٪) را گزارش کرده‌اند (۷). در ایران، میزان مرگ و میر ناشی از آبله گوسفندی حاد در شهر قم در گله‌های حساس میزان ۷۵-۱۰۰ گزارش شده است (۹). عامل این بیماری ویروس آبله گوسفند (SPV) از جنس Capripoxvirus (CaPV) بوده که از بزرگترین و پیچیده‌ترین ویروس‌های شناخته شده هستند. P۳۲ یکی از پروتئین‌های غشائی و آنتی‌ژنیک ویروس آبله می‌باشد که جز نواحی حفاظت شده می‌باشد که می‌توان در مطالعات ساخت دارو از آن بهره جست (۲۰).

هیچ درمان موثری برای عفونت آبله گوسفند و بز وجود ندارد. استراتژی‌های مدیریتی باید برای کنترل عفونت باکتریایی ثانویه استفاده گردند. مطالعات نشان داده‌اند که تجویز تزریقی آنتی‌بیوتیک برای کنترل عفونت‌های باکتریایی ثانویه مهم است. راه کارهای دیگر نظیر شستشوی سوراخ بینی حیوان با محلول ضعیف پرمنگنات پتاسیم (۱:۱۰۰۰۰) و تمیز کردن آن علائم مربوط به تنفس را از بین می‌برد. استفاده موضعی از پماد آنتی‌بیوتیک برای ضایعات پوستی مهم است. گزارش شده است که گرمایش در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۱۳۳ درجه فارنهایت) به مدت ۲ ساعت یا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۱۴۹ درجه فارنهایت) به مدت

آمد (پیرخضرانیان و همکاران، ۲۰۲۰). توالی آمینواسیدی پروتئین سطحی P۳۲ از سایت NCBI با کد دسترسی AHBV۲۷۲۳ با فرمت FASTA دریافت گردید. ساختار مربوط به رسپتورهای P۳۲ نظیر همپارین سولفات (۵۳۴۷۷۷۱۴) و UDP-N-استیل گلوکوزآمین (۴۴۵۶۷۵) از سایت PubChem تهیه شد. با استفاده از نرم افزار Pymol رسپتور (پروتئین P۳۲) و لیگاندها (CLF۳۶ و CLFarm) جهت حذف مولکولهای آب، افزودن مولکولهای هیدروژن و مشخص نمودن بار جزئی به منظور خنثی سازی سیستم جهت داکینگ مولکولی انجام شد.

پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین سطحی P۳۲

به دلیل عدم وجود ساختار سوم ثبت شده از پروتئین P۳۲ از روش پیش بینی ساختار سوم پروتئین به منظور ایجاد بهترین ساختار استفاده شد. برای پیش بینی و مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین ها از سرورهای I-TASSER استفاده شد و ساختار از طریق نرم افزار Pymol قابل مشاهده گردید.

بررسی ویژگی های ساختار پروتئین پیش بینی شده

مدل پیش بینی شده از طریق سرور آنلاین SAVESv۶/۰ (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) جهت بررسی صحت پیش بینی مورد ارزیابی واقع شد. در این سرور بخش های مربوط به ERRAT و PROCHECK ارزیابی واقع شدند. از نرم افزار ProsA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) جهت بررسی پارامتر Z-score نیز استفاده گردید.

حداقل سازی انرژی ساختار پیش بینی شده

پایداری ساختار P۳۲ از طریق دینامیک مولکولی (MD) به کمک نرم افزار گرومکس نسخه ۵/۲/۴ استفاده از میدان نیرو GROMOS ۵۴A۷ و مولکول های آب E/SPC۲۱۶ به مدت ۲۰۰ نانوثانیه شبیه سازی شد. مولکول مورد نظر در فضای مرکزی جعبه مکعبی شبیه سازی شده با فاصله ۱ nm از دیواره ها و با شرایط مرزی متناوب قرار داده شد. خنثی سازی این سیستم با استفاده از یون های سدیم و کلر انجام شد. انرژی الکترواستاتیک کل هر جعبه تناوبی با استفاده از روش جمع بندی PME اندازه گیری و برهمکنش های غیرپیوندی (نیروهای الکترواستاتیک و واندروالس) نیز از طریق مدل لنارد-جونز با شعاع قطع ۱۰°A تخمین زده شدند. کوپل کردن دما (۳۱۲ درجهی کلین) و فشار قبل از انجام شبیه سازی اصلی به مدت ۱ ps انجام شد. در نهایت، شبیه سازی MD در ۲۰۰ ns و شرایط معادل انجام گردید (موسوی و همکاران، ۲۰۲۲).

داکینگ مولکولی

با استفاده از نرم افزار HDock (<http://hdock.phys.huast.edu.cn/>) اقدام به بررسی پیش بینی برهمکنش بین پپتیدهای مورد نظر و پروتئین P۳۲ شد (که در مرحله قبل از تمام فیلترها امتیاز مناسب را کسب کرده بود) و بهترین داکینگ از نظر انرژی اتصال و موقعیت مهار پروتئین P۳۲ مشخص شد تا بتوان آن ها را وارد محیط شبیه سازی کرد. جهت افزایش دقت پیش بینی ها داکینگ ها سه مرتبه تکرار شدند. فایل PDB خروجی در نرم افزار Pymol با توجه به موقعیت و انرژی اتصال، طول و قدرت پیوند

۳۰ دقیقه، ویروس CaPV را از بین می برد. اگرچه برخی از سویه ها به اتر مقاوم هستند، ویروس CaPV عموماً توسط کلروفرم، فرمالین و اتر ۲۰ درصد غیرفعال می شوند. با این حال، هنگامی که این مواد شیمیایی به طور گسترده یا نادرست استفاده شوند، برای محیط زیست و سلامت انسان خطرناک می شوند. بنابراین، جستجو برای جایگزین های جدید طبیعی، ایمن و سازگار با محیط زیست، به طور مثال پپتیدهای ضد ویروسی، مورد توجه قرار گرفته است (۶).

پپتیدهایی که پتانسیل مهار ویروس را دارند به عنوان پپتیدهای ضد ویروسی (AVPs) در نظر گرفته می شوند. معمولاً AVP ها با مهار مستقیم ویروس، اثرات ضد ویروسی از خود نشان می دهند، اما جایگاه های مهار و مکانیسم عمل آن ها در چرخه تکثیر ویروسی متفاوت است. AVP ها را می توان از طریق رویکردهای مختلف به دست آورد: ۱- رویکرد محاسباتی ۲- منابع طبیعی و ۳- منابع بیولوژیکی. از آنجایی که زمینه پپتیدها به عنوان ضد ویروس به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین، مطالعات تحقیقاتی زیادی برای روشن کردن نقش پپتیدها در کنترل عفونت های ویروسی در حال انجام است. امروزه مطالعات نشان داده اند که پپتید کلایمر CLF۳۶ مشتق شده از پروتئین لاکتوفرین شتری فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی از خود نشان داده است (۱۷). CLF۳۶ پپتید کاتیونی بسیار کوچک با ۳۶ اسید آمینه (تلفیقی از ۱۷-۳۰ لاکتوفریسین و ۲۶۵-۲۸۴ لاکتوفرامین متصل شده از طریق لایزین) می باشد که ساختار آن از دو مارپیچ آلفا تشکیل شده است (۲). گزارش شده است که این پپتید بصورت خوراکی در حیوانات استفاده شده است (۲) و می تواند به عنوان کاندیدای مناسب جهت بررسی فعالیت ضد ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. پیرخضرانیان و همکاران، (۱۴) با انجام تغییراتی در توالی و تعداد اسید آمینه های پپتید CLF۳۶ منجر به تولید ۴ پپتید دیگر با عملکرد مطلوب تر گردید. این محققین گزارش کردند که از بین این ۴ پپتید، CLFarm عملکرد بهتری را نشان داد.

استفاده از روش های بیوتکنولوژی برای تولید انبوه دارو به همراه بکارگیری از تکنولوژی بیوانفورماتیک به منظور پیش بینی برهمکنش میان دارو و سوبسترا راهی مناسب جهت کاهش هزینه ها و افزایش سرعت در تولید داروها می باشد. امروزه با توجه به گسترش تکنولوژی و روش های آزمایشگاهی و همچنین هزینه های بالای آن ها، استفاده از روش های محاسباتی مانند داکینگ مولکولی برای تخمین فعالیت مولکول های مختلف به عنوان کاندیدای دارویی پیش از سنتز آن ها، فرایند کشف داروهای جدید را تسریع و موجب کاهش هزینه ها می شود (۱۱). با توجه به مشکلات رایج درمان بیماری آبله گوسفندی و مشکلات پیرامون درمان، همچنین هزینه های بالای کارهای آزمایشگاهی، لذا هدف از این پژوهش بررسی برهمکنش پپتید CLF۳۶ و CLFarm با پروتئین P۳۲ و رسپتورهای آن به عنوان پیشنهادی برای درمان بیماری آبله گوسفندی از طریق روش های داکینگ و دینامیک مولکولی است.

مواد و روش

استخراج فایل اطلاعات ساختاری

ساختار سه بعدی پپتید CLF۳۶ و CLFarm از مطالعات قبلی به دست

دسترسی یافت (۲۱). امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک که مولکول‌های کوچک را در ساختار مولکول هدف پروتئینی شبیه‌سازی می‌کنند و به میزان جفت‌شدن لیگاند با جایگاه فعال یا قسمتی از رسپتور شناخته شده امتیاز می‌دهند، مورد توجه قرار گرفته است (۱۵).

در این مطالعه ساختار سوم پروتئین P۳۲ با موفقیت توسط سرور I-TASSER پیش‌بینی شد و بهترین مدل با C-score برابر با ۱/۳ انتخاب شد. C-score معمولاً در محدوده (۲ الی -۵) قرار دارد، که هر چقدر این امتیاز بالاتر باشد، نشان‌دهنده مدلی با اطمینان بالاتر است و بالعکس (۱۹). پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین سطحی P۳۲ در چندین گام مورد ارزیابی قرار گرفت. معمولاً بعد از پیشگویی ساختار سوم یک پروتئین به‌منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای ساختاری مدل ساخته شده نمودار رامچاندرا برای الگو و پروتئین هدف ترسیم می‌شود. نمودار رامچاندرا وضعیت مجاز هر زاویه را برای ساختارهای پروتئین نشان می‌دهد (۴). صحت بر اساس پلات رامچاندرا گزارش شده، اکثر اسیدآمینه‌های ساختار P۳۲ در ناحیه مطلوب قرار گرفته‌اند (۸۷ درصد) که نشانه‌ی خوبی جهت ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار پیش‌بینی شده است (شکل ۱). در نمودار رامچاندرا زوایای چرخش ψ و ϕ برای تمامی مانده‌های پروتئین در محورهای X و Y قابل مشاهده است. زاویه ϕ (فی) چرخش را حول باند کربن آلفا و N اسیدآمینه را نشان می‌دهد در حالیکه زاویه ψ (سای) چرخش را حول باند کربن آلفا و C اسیدآمینه را مشخص می‌نماید. از آنجایی که پروتئین‌ها دچار فرایند تاخوردگی (Folding) می‌شوند؛ زوایای فی و سای در محدوده‌ی $+180^\circ$ تا -180° بسته به نوع زنجیره‌ی جانبی قرار می‌گیرند. ترکیباتی که اتم‌ها در آن در فاصله‌ی نزدیکتر از مجموع شعاع واندوالسی آن‌ها قرار می‌گیرند نواحی غیر مجاز یا پرت نقشه را می‌سازند. در این پیش‌بینی این نواحی ۱ درصد را تشکیل

دهیدروژنی، اسیدآمینه‌های درگیر در برهمکنش لیگاند-رسپتور ارزیابی شدند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس پروتئین-لیگاند

در ابتدا یکی از مدل‌های خروجی داکینگ از سرور HDOCK انتخاب شد. از طریق کامند touch یک فایل pdb برای لیگاند تشکیل داده شد. فایل pdb مدل منتخب از طریق text editor باز شد و از قسمت مربوط به HEADER لیگاند تا قسمت TER جدا کرده و وارد فایل جدید گردید. در این مرحله لیگاند و رسپتور از یکدیگر جدا شدند. با استفاده از خط فرمان `gmx pdb2gmx` فایل توپولوژی، `gro` و `porse` هم برای لیگاند و هم برای رسپتور تشکیل داده شد. در ادامه‌ی شبیه‌سازی فایل‌های توپولوژی include شده و میکس گردیدند و بقیه مراحل مشابه شبیه‌سازی P۳۲ در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه صورت گرفت.

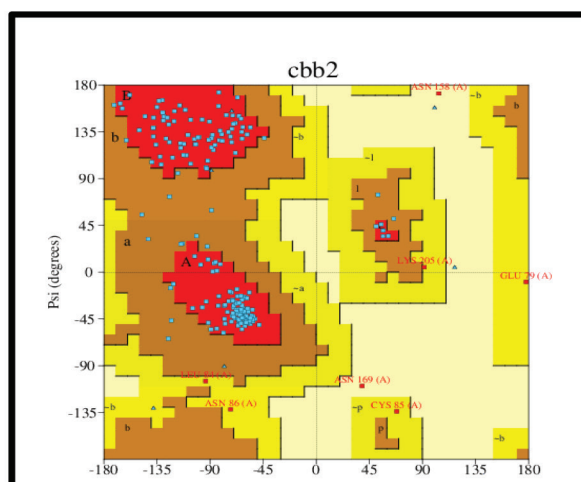
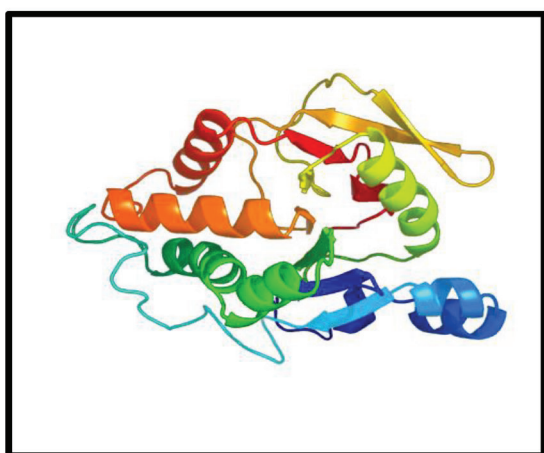
تجزیه و تحلیل

در نهایت نمودارهای مربوط به انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD)، میانگین نوسانات (RMSF)، شعاع چرخشی (Gyrate) و همچنین پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک مورد ارزیابی واقع شدند.

نتایج و بحث

نتایج پیش‌بینی ساختار سوم P۳۲ و ارزیابی دقت پیش‌بینی

ساختار سوم پروتئین‌ها بطور تجربی از طریق روش‌هایی نظیر بلور نگاری پرتوی ایکس و NMR مشخص می‌شود و حجم زیادی از اطلاعات در مورد ساختار پروتئین‌ها فراهم شده است که از طریق آن‌ها می‌توان به اصول بنیادی ساختمان پروتئین‌ها و برهم کنش‌های آن‌ها با سایر ترکیبات



شکل ۱- نقشه‌ی رامچاندرا حاصل از پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین P۳۲ آبله گوسفندی.

انرژی بیانگر کیفیت بهتر شبیه‌سازی است چرا که انرژی کم‌تر در حالت پایدار بیش‌تر حاصل می‌شود. نتایج RMSD پروتئین P۳۲ در مدت زمان ۲۰۰ نانوثانیه نشان داد تغییرات انرژی در این نمودار پس از حدود ۱۰۰ نانوثانیه روند نسبتاً ثابتی را نشان داد و در مدت زمان ۱۰۰ تا ۱۳۰ روند یک شیفت افزایشی و در باقی مسیر (۱۵۰ تا ۲۰۰ نانوثانیه) با نوسان ثابتی همراه بوده است. بنابراین مدل ساخته شده در طول زمان شبیه‌سازی پایدار شده است. میزان RMSD حدود ۰/۵۹ nm گزارش شد. RMSF مخفف میانگین ریشه نوسانات (root mean square fluctuation) است. RMSF همانند RMSD یک اندازه‌گیری عددی است، با این تفاوت که در RMSF به جای نشان دادن تغییر موقعیت اتم قبل و بعد از شبیه‌سازی میزان انعطاف‌پذیری هر یک از اسیدهای آمینه را طی فرآیند شبیه‌سازی نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار زیر مشهود است، RMSF مربوط به پیش‌بینی ساختار P۳۲ تقریباً روال یکنواختی را نشان می‌دهد.

شعاع چرخشی یا ژیراسیون (gyrate)، میانگین مربعات فواصل بین اتم‌های یک مولکول از مرکز ثقل آن می‌باشد. این نمودار قادر است میزان تراکم، انبساط و تاخوردگی یک مولکول را در طول شبیه‌سازی نشان دهد. این پارامتر برای مولکول‌هایی با اندازه‌ی بزرگ که بیشتر دچار نوسانات هستند؛ بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به منظور بررسی میزان فشردگی ساختار پروتئین P۳۲، شعاع چرخشی بررسی شد. شعاع چرخشی در اصل پایداری و ثبات پروتئین را در محیط شبیه‌سازی شده در طول ۲۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی بررسی کرده و ثبات آن را در محیط شبیه‌سازی بر اساس میزان تاخوردگی نشان می‌دهد. هرچه روند پیشروی

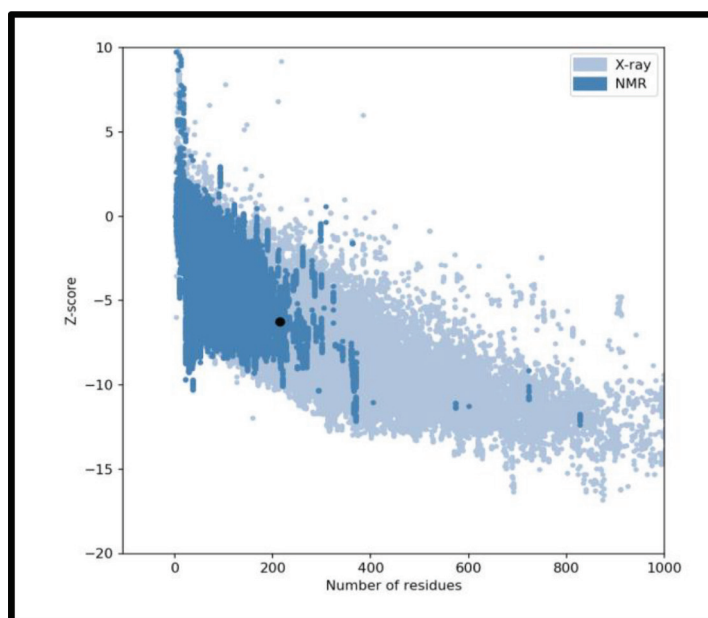
می‌دهند که قابل قبول است (۴).

علاوه بر این، مقدار Z-score در نمودار به‌دست‌آمده از سرور ProsA برابر با ۶/۲۷- گزارش شد. این نمودار با توجه به طول زنجیره‌های پروتئین که در پایگاه داده وجود دارند (ساختار پروتئین‌های کریستالوگرافی شده (آبی روشن) و ساختارهای اسپکتروسکوپی NMR (آبی تیره) ساخته شده است و کیفیت کلی پروتئین را نشان می‌دهد. اگر امتیاز گزارش شده برای پروتئین مورد مطالعه خارج از محدوده مشخصه (قدر مطلق ۲-۱۵) برای مدل واقعی با اندازه مشابه باشد، ساختار احتمالاً دارای خطاهایی است (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر نمودار Z-score (شکل ۲) نشان می‌دهد ساختار پیش‌بینی شده در محدوده مجاز این نمودار قرار دارد. که می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً مدل پیش‌بینی شده با آنچه که در طبیعت وجود دارد قابل تطابق می‌باشد.

ERRAT یک سرور آنلاین است که ساختار سه‌بعدی پروتئین را برپرس اتصال هسته‌ای بین اتم‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌دهد (۱). بررسی نمودار ERRAT به‌دست‌آمده توسط سرور SAVE v۶,۰ که میزان فاکتور کیفیت پروتئین مورد نظر را نشان می‌دهد، برای پروتئین P۳۲ میزان ۹۱/۲۸ درصد می‌باشد.

دینامیک مولکولی پروتئین P۳۲

RMSD یا خطای جذر میانگین مربعات ((root-mean-square deviation) تفاوت میان ساختار پیش‌بینی شده توسط مدل یا برآوردگر آماری و ساختار واقعی می‌باشد که بیان‌کننده پایداری مدل در طول مدت زمان شبیه‌سازی می‌باشد. در نمودار RMSD کاهش شیب نمودار



شکل ۲- نمودار Z score رسم شده از پروتئین P۳۲ از آبله گوسفندی.

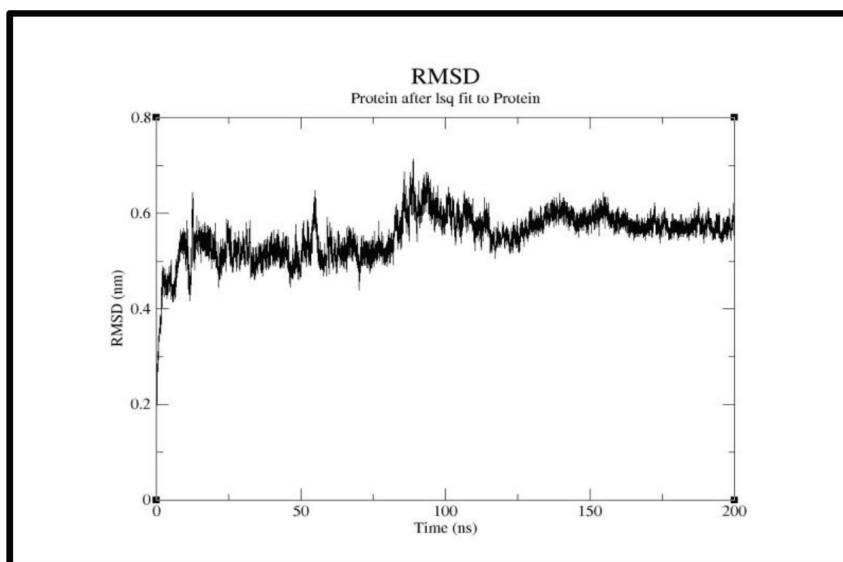
نمودار ژیراسیون دارای افت باشد به این معنی است که ساختار در حال تراکم است و در صورتی که این پارامتر سیر افقی را طی کند می‌توان اظهار داشت که ساختار پایدار بوده و در شرایط دینامیکی مد نظر دچار تغییر نشده است. نمودار زیر نشان می‌دهد که ساختار پروتئین P32 در شرایط دینامیکی ثبات کلی خود را حفظ کرده و مجموعاً تراکم و انبساطی را در طول دوره‌ی شبیه‌سازی تجربه نکرده است.

دائینگ مولکولی پپتید CLF36 و CLFarm با پروتئین P32

به منظور بررسی اثرات متقابل پپتید کایمر CLF36 و پپتید مهندسی شده CLFarm با هدف ضد ویروسی، از پروتئین سطحی ویروس آبله‌ی گوسفندی با نام پروتئین P32 استفاده شد. از نرم‌افزار بیوانفورماتیکی HDock جهت داکینگ و بررسی برهمکنش بین این دو پپتید با پروتئین P32 استفاده گردید. این نرم‌افزار محتمل‌ترین حالت‌هایی که برای این برهمکنش‌ها پیش می‌آید را با ایجاد جهت‌گیری‌های مختلف از اتصال بین رسپتور و لیگاند به نمایش می‌گذارد. مدل‌هایی که توسط این نرم‌افزار تا کنون ساخته شده است در بیش از ۲۰۰ نشریه ارائه شده‌اند. در ارتباط با نتایج داکینگ CLF36 و CLFarm به صورت خلاصه در جدول (۱) آورده شده است. امتیاز اطمینان در سرور HDock ملاکی برای سنجش میزان صحت و اعتبار نتیجه‌ی یک داکینگ موفق است. تقریباً وقتی امتیاز اطمینان بالای ۰/۷ باشد، احتمال اتصال دو مولکول بسیار زیاد است. هنگامی که امتیاز اطمینان بین ۰/۵ و ۰/۷ باشد، اتصال دو مولکول امکان‌پذیر است و میزان این امتیاز زیر ۰/۵ نشان‌دهنده‌ی این موضوع است که دو مولکول به احتمال ضعیفی به یکدیگر متصل می‌شوند. با این وجود، امتیاز اطمینان در این سرور به دلیل ماهیت تجربی آن باید با دقت مورد بررسی قرار گیرد. در ارتباط با نمره داکینگ در این سرور هر

چقدر به ۲۰۰ - و بالاتر نزدیک‌تر باشد ممکن است اتصال قوی‌تر باشد. ضریب اطمینان و امتیاز داکینگ مربوط به اتصال CLF36 به رسپتورهای سطحی UDP-N- استیل گلوکز آمین و هپارین سولفات کمترین میزان را به خود اختصاص داد و اتصال CLFarm به این دو رسپتور در وضعیت بهتری مشاهده شد. در صورتی که اتصال CLF36 و CLFarm به پروتئین P32 بیشترین ضریب اطمینان و امتیاز داکینگ را به خود اختصاص داد؛ لذا در مراحل بعدی به بررسی دینامیک مولکولی این دو اتصال پرداخته شد.

کومار و همکاران (۸) به پیش‌بینی نواحی اپی توپ موجود در پروتئین P32 پرداختند. این محققین گزارش کردند که طول اپی توپ پیش‌بینی شده P32 به قرار زیر است: EP1 (۲۱-۳۶)، EP2 (۶۶-۹۴)، EP3 (۱۱۰-۱۱۸)، EP4 (۱۵۵-۱۸۱)، EP5 (۲۲۰-۲۲۴)، EP6 (۱۱-۱۹)، EP7 (۱۹۹-۲۱۰)، EP8 (۱۴۰-۱۴۷) بود. از بین این اپی توپ‌ها نواحی EP3، EP6، EP8 و آنتی‌ژن‌سیستی بیشتری را نشان دادند. در مطالعه‌ی حاضر آنالیز اتصال پپتیدها با P32 در نرم افزار Pymol نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، CLF36 از طریق ۱۰ اسید آمینه و ۱۷ پیوند هیدروژنی با طول زیر ۳ آنگستروم به اسید آمینه‌های مربوط به اپی توپ‌های پروتئین P32 (EP1 شامل E22 و K24)، (EP4 شامل E168 و N169) و (EP8 شامل Q143) متصل شد. در حالی که، CLFarm توانست از طریق ۸ اسید آمینه و ۱۵ پیوند هیدروژنی با طول زیر ۳ آنگستروم به اپی توپ‌های پروتئین P32 (EP1 شامل E22)، (EP4 شامل E168 و N170) و (EP8 شامل I140 و E144 و E141) متصل شود (جدول ۲). اسید آمینه‌های پپتید CLF36 درگیر در ایجاد پیوند هیدروژنی با P32 شامل D1، K5، V8، Q11، K9، R16، R22، K25، R27 و K34 و برای CLFarm شامل K5، K9، Q11، K13، R27، W30، Q31 و K35 می‌باشد.



شکل ۳-۴- نمودار ERRAT رسم شده از پروتئین P32.

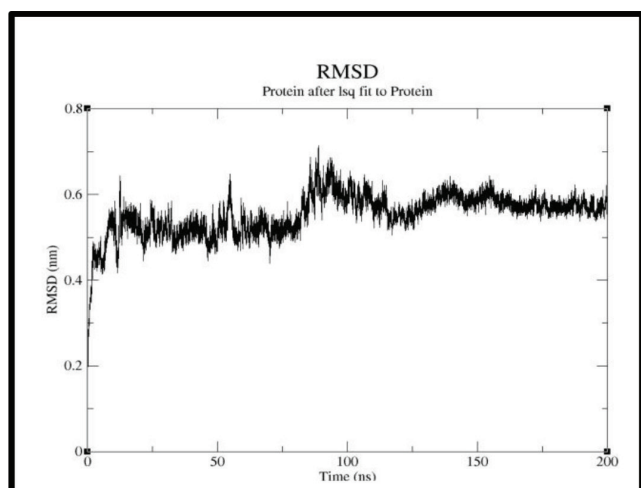
bovis از طریق داکینگ مولکولی پرداختند. نتایج این محققین نشان داد بیشترین تعداد پیوندها در برهمکنش پروتئین‌های LPXTG و LysM با پپتید نو ترکیب CLF۳۶ به ترتیب در اسید آمینه‌های K۹، K۳۴ و G۱۵، R۲۲ بودند؛ همچنین در برهمکنش با پپتید مهندسی شده CLFarm به ترتیب اسید آمینه‌های K۱۸، R۱۶، K۳۴، K۳۵ و K۱۳، K۳۴ مشاهده شدند. این محققین اظهار داشتند که پپتید مهندسی شده CLFarm تعداد پیوند بیشتری را ایجاد کرده است که همراستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر نبود. پاک‌نفس و همکاران (۱۳) نشان دادند که برهمکنش CLF۳۶ با پروتئین OMPC باکتری گرم منفی با تعداد ۵ پیوند هیدروژنی قوی توسط اسید آمینه‌های LYS۱۸، LYS۵۰، ASP۱۰ و ARG۲۷ صورت گرفت. همچنین پپتید CLFARM با اسید آمینه‌های LYS۱۲، LYS۲۱، TRP۳۰ و LYS۳۴ ایجاد ۹ پیوند هیدروژنی کردند. از بین این اسید آمینه‌ها LYS و ARG بیشترین قدرت پیوند را دارا بودند. صاحب‌نظر و همکاران (۱۶) به بررسی تأثیر ضد ویروسی پپتید CLF۳۶ با سه آنتی‌ژن سطحی ویروس آنفولانزای طیور (H۵N۸) از طریق داکینگ مولکولی پرداختند. این محققین اظهار داشتند که بیشترین و قوی‌ترین اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی لایزین و آرژنین هستند که در مطالعه‌ی حاضر نیز این دو اسید آمینه درگیر در پیوندهای هیدروژنی هستند. در طبیعت، انواع مختلفی از پپتیدهای ضد میکروبی وجود دارند که پپتیدهای کاتیونی بخش بزرگی از این خانواده را تشکیل می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند که تغییر محتوای آرژنین یا لیزین پپتیدهای کاتیونی می‌تواند بر میزان فعالیت ضد میکروبی آن‌ها تأثیر بگذارند. دیگر پژوهشگران گزارش کردند که جایگزین کردن اسید آمینه‌های دارای بار مثبت نظیر لایزین ۲۷۷، لایزین ۲۶۹ و لایزین ۲۸۲ با اسید آمینه‌ی آلانین در لاکتوفرامپین گاوی که معادل لایزین ۹، لایزین ۱۳ و لایزین ۱۸ در CLF۳۶ هستند،

اکثر این آمینو اسیدها دارای بار مثبت (آرژنین و لایزین) هستند. در ارتباط با داکینگ مولکولی بین CLF۳۶ arm و دو رسپتور UDP-N-استیل گلوکز آمین و هپارین سولفات اتصالات هیدروژنی به ترتیب شامل Gln ۱۱، Trp ۳۰، Trp ۴، Gln ۱۱، Arg ۲۷، Cys ۳۳ بود (جدول ۳). پپتید CLF۳۶ از اتصال دو پپتید فعال لاکتوفریسین-لاکتوفرامپین شتری از ۳۶ اسید آمینه تشکیل شده است (۲). تاکنون فعالیت‌های ضد میکروبی نظیر فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد سرطانی آن بر روی تعدادی از بیماری‌ها در دام و طیور در محیط آزمایشگاه به اثبات رسیده است. اشکال مختلف مهندسی شده‌ی این پپتید با هدف افزایش فعالیت ضد میکروبی آن صورت گرفته است. یکی از پپتیدهای مشتق شده از CLF۳۶، می‌توان به CLFarm اشاره کرد. در واقع این پپتید با تغییر اسید آمینه‌ی E۱۲ به S۳۵ و به ترتیب به A۱۲ و K۳۵ و همچنین حذف S۳۶ ایجاد شده است. توالی اسید آمینه‌ای پپتید CLF۳۶ و پپتید CLFarm به صورت زیر می‌باشد:

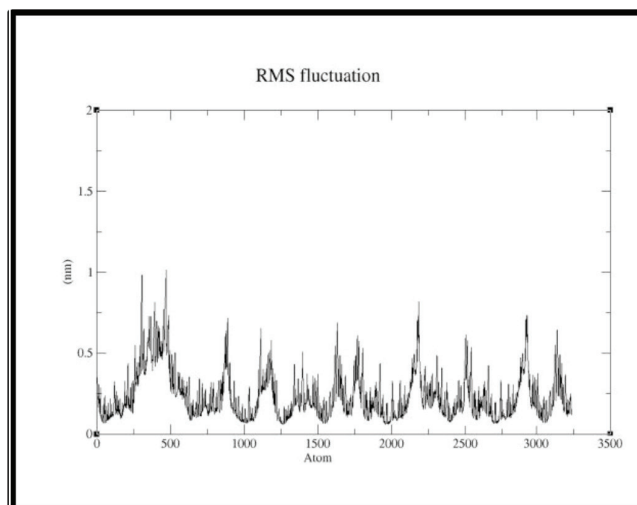
CLF36:DLIWKLLVKAQEKFGGRGKPSKRVKKMRRQWQACK SS-

CLFarm:DLIWKLLVKAQAKFGGRGKPSKRVKKMRRQWQAC KK

پیرخضرائیان و همکاران (۱۴) با تغییر تعداد اسید آمینه‌های پپتید CLF۳۶ منجر به ایجاد ۴ پپتید مهندسی شده از این پپتید شدند. با بررسی میزان فعالیت این پپتیدها نشان دادند که CLFarm با تعداد ۳۵ اسید آمینه نسبت به سایر پپتیدهای مهندسی شده و همچنین CLF۳۶ عملکرد بهتری را دارا می‌باشد (۱۴). میرزاوی و همکاران (۱۰) به بررسی برهمکنش پپتید کایمر CLF۳۶ و پپتید مهندسی شده CLFarm با پروتئین‌های سطحی LPXTG و LysM در باکتری Corynebacterium



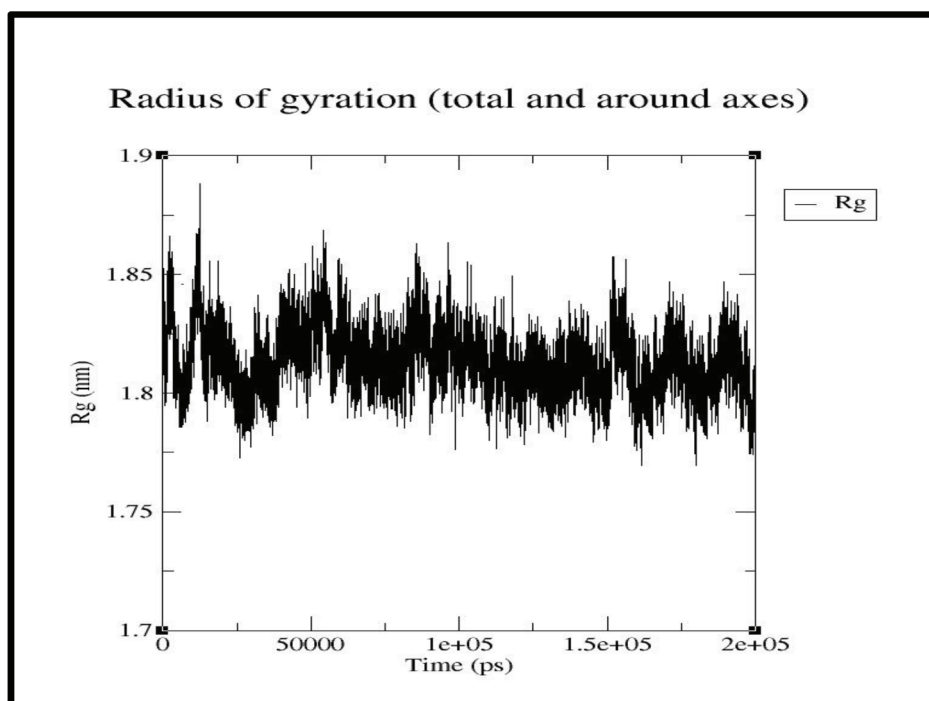
شکل ۳- نمودار RMSD رسم شده از پروتئین P۲۲ آبله گوسفندی.



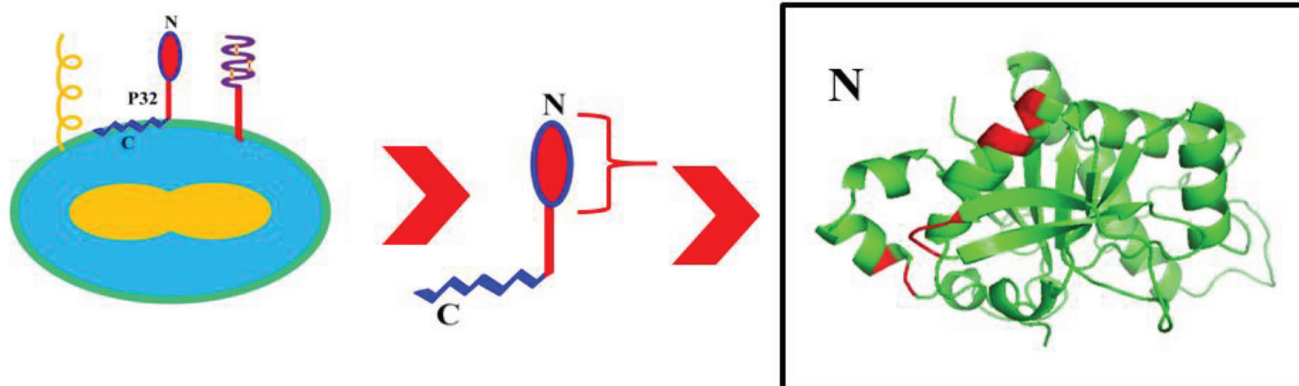
شکل ۴- نمودار RMSF رسم شده از پروتئین P۲۲ آبله گوسفندی.

سره‌های قطبی غشاء باکتری می‌شود. زنجیره‌های جانبی باردار با سرهای قطبی واکنش می‌دهند و اجازه می‌دهند سطوح آب‌گریز به داخل غشای دو لایه نفوذ کند. اسید آمینه آرژینین دارای یک گروه گوانیدیوم با ساختاری پهن است که قادر است بار مثبت را بیشتر پخش کند؛ از این رو این اسید آمینه امکان تشکیل پیوندهای هیدروژنی را افزایش

منجر به افت قابل توجهی در میزان فعالیت ضد میکروبی این پپتید می‌گردد (۱۸). در پژوهشی که بر روی آنالوگ‌های آیورین ۱،۲ انجام شد به بررسی دو آنالوگ F^3W و RW/G^1F^3 که تنها در یک اسید آمینه آرژینین با یکدیگر متفاوت بودند پرداخته شد. این محققین اظهار داشتند که بار مثبت اضافی مربوط به باقی مانده آرژینین، باعث میانکشی با



شکل ۵- نمودار شعاع چرخشی رسم شده از پروتئین P۳۲ آبله گوسفندی.

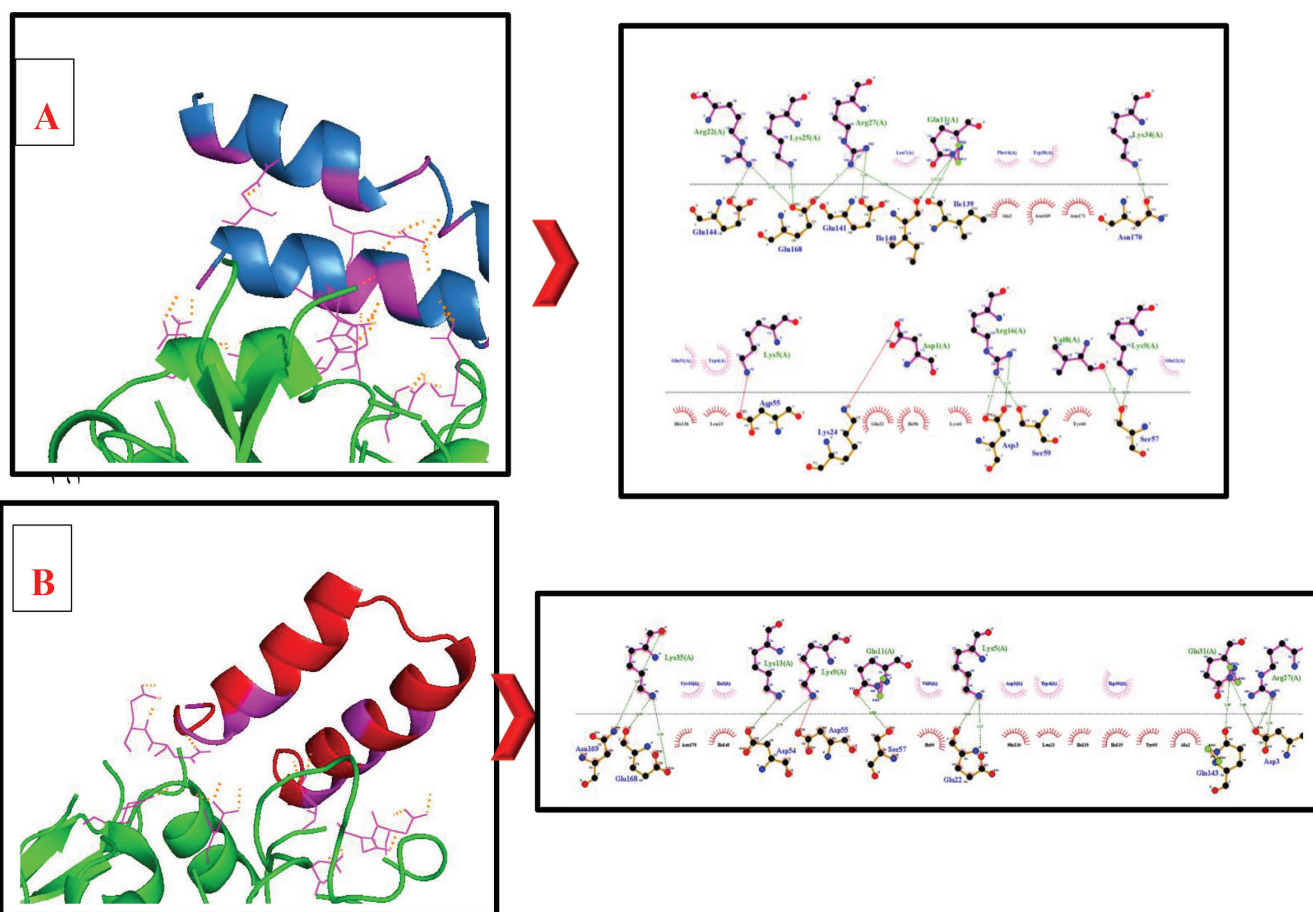


شکل ۶- نواحی اتصال پپتید CLF۳۶ و CLFarm به پروتئین P۳۲ (رنگ قرمز) که در سطح این پروتئین قرار دارد.

دینامیک مولکولی پپتید CLF۳۶ و CLFarm با پروتئین P۳۲

نتایج RMSD برای هر دو پپتید در تعامل با پروتئین P۳۲ در طول مدت ۵۰ نانوثانیه پایداری نسبی را نشان داد. همانطور که در شکل ۱۰ قابل مشاهده است، پپتید CLFarm، از ابتدای شبیه‌سازی تا مدت زمان ۲۰ ns نوسانات افزایشی کمی را داشته که ممکن است اتصال در این مدت زمانی دچار تغییرات ساختاری شده (یا اتصالی شکسته شده یا تشکیل شده است) و سپس بعد از این مدت برهمکنش با میزان RMSD حدود ۰/۳۳ nm به پایداری رسیده است (شکل ۱۰). در ارتباط با پپتید CLF۳۶ روال کلی مشابه با CLFarm بود با این تفاوت که پایداری با RMSD حدود ۰/۳۵ nm اتفاق افتاد و میزان نوسانات در CLFarm نسبت به CLF۳۶ کمتر بود. به طور کلی هر چقدر تعداد پیوندهای هیدروژنی قوی بیشتر باشد میزان نوسانات RMSD پپتید کمتر خواهد بود. به طور کلی میزان RMSD هر چقدر کمتر باشد احتمال پایداری اتصالات افزایش می‌یابد. مطابق با تصویر زیر، نوسانات نسبتاً مشابهی در CLF۳۶ در مقایسه با CLFarm اتفاق افتاد. نمودار مربوط به CLF۳۶ نشان داد که

داده و به همین دلیل قادر به اتصال قوی‌تر به غشار و ایجاد اختلال در سطح غشاء می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر نیز هم در CLF۳۶ و هم در CLFarm تحرک پذیری در دو انتهای پپتیدها بیشتر بود. دیگر مطالعات نشان دادند که هسته ۶ آمینواسیدی RRWQWR در لاکتوفرین گاوی نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی این پپتید ایفا می‌کند. در سیستم شبیه‌سازی شده در مطالعه‌ی حاضر، اسید آمینه اول از این هسته مرکزی در CLF۳۶ و CLFarm (آرژنین ۲۷) نقش مهمی در پیوند هیدروژنی با P۳۲ را نشان دادند. هم راستا با این پژوهش‌ها، در مطالعه‌ی حاضر نیز بیشترین اسیدهای آمینه با کوتاه‌ترین طول پیوند در داکینگ بین CLF۳۶ و CLFarm با P۳۲ مربوط به لایزین و آرژنین بود. در مطالعه‌ای که توسط پیرخضرانیان و همکاران (۱۴) که بر روی ساختار CLF۳۶ صورت گرفت، نشان داده شد که این پپتید بیشترین فعالیت خود را از طریق دو مارپیچ آلفا اعمال می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر نیز بیشتر اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی در همین ناحیه واقع بودند و کمترین نوسانات در نمودار RMSF در این نواحی بود.



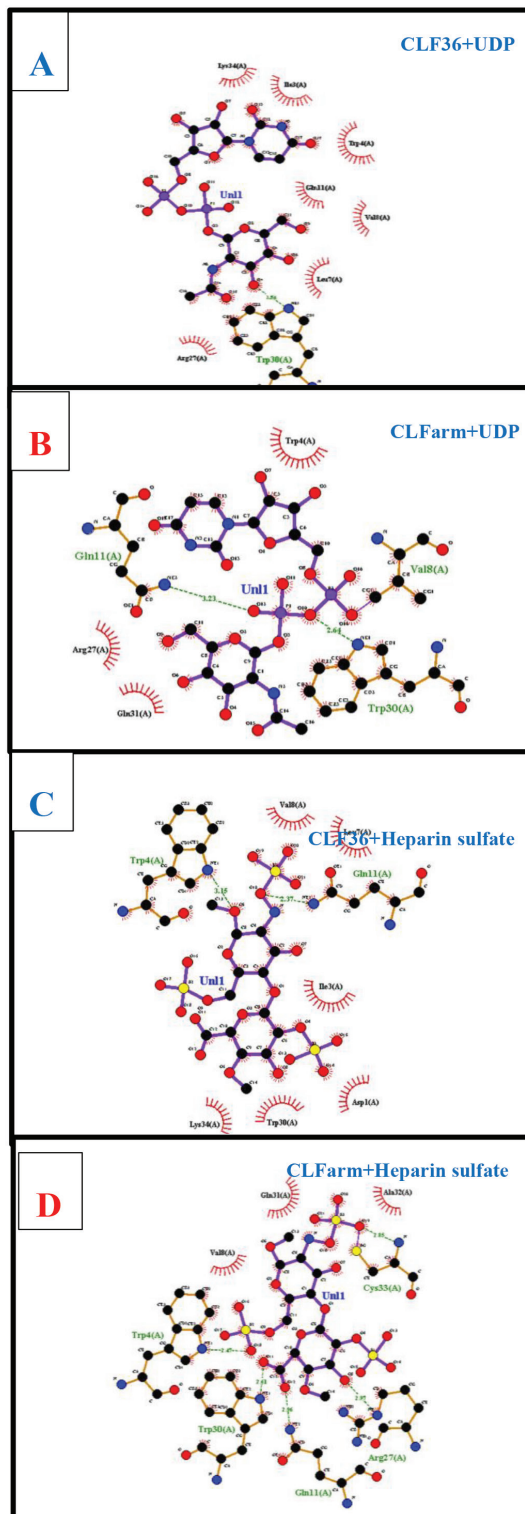
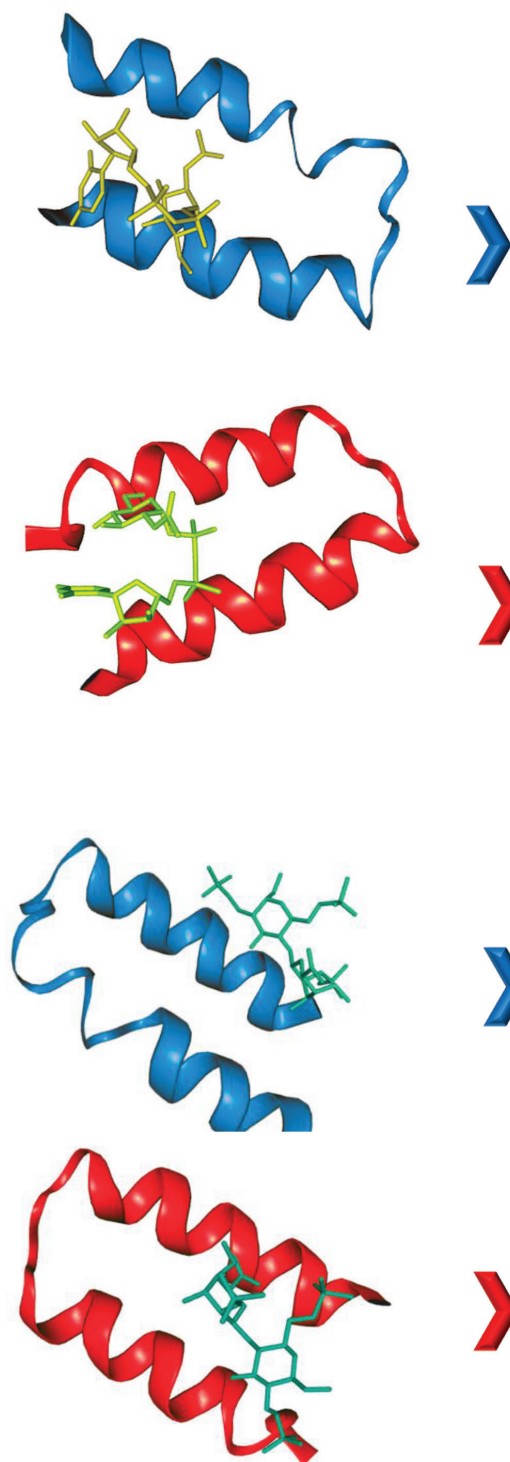
شکل ۷- پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک بین پپتید CLF۳۶ (A) و CLFarm (B) با پروتئین P۳۲.

جدول ۱- نتایج داکینگ مولکولی با سرور HDOCK.

داکینگ	انرژی اتصال	نمره اطمینان
CLF-۳۶P۳۲	- ۲۶۳/۰۱	۰/۹۰
CLFarm-P۳۲	- ۲۲۵/۳۰	۰/۸۱
CLF+۳۶UDP	- ۱۳۲/۱۶	۰/۴۱
CLF+۳۶ Heparin sulfate	- ۱۴۷/۲۲	۰/۴۸
CLFarm+UDP	- ۱۵۲/۹۰	۰/۵۱
CLFarm+ Heparin sulfate	- ۱۵۷/۹۴	۰/۵۳

جدول ۲- پیوندهای هیدروژنی درگیر در برهمکنش CLF۳۶ و CLFarm با پروتئین سطحی P۳۲.

پپتید CLF۳۶	P۳۲	طول پیوند (°A)	تعداد پیوند	پپتید CLFarm	P۳۲	طول پیوند (°A)	تعداد پیوند
D۱	E۲۲	۱/۲	۲	K۵	E۲۲	۸/۱, ۲/۲	۲
	K۲۴	۶/۲			D۵۵		
K۵	S ۵۷	۱/۷	۱	K۹	D۵۴	۱/۸ ۱/۸	۲
Q۱۱	I۱۳۹	۲/۴	۱	Q۱۱	S۵۷	۱/۹	۱
	I۱۴۰	۱/۹				۱/۸	
V۸	S ۵۷	۱/۹	۱	K۱۳	D۵۴	۱/۹, ۲/۱	۱
K۹	S ۵۷	۱/۷	۱	R۳۷	D۵۴		۲
R۱۶	D۲	۱/۸	۳	Q۳۱	Q۱۴۳	۲/۱	۱
		۲/۶			D۲	۲/۸	۱
		۱/۸					
R۲۲	E۱۴۴	۱/۹, ۲	۲	K۳۵	E۱۶۸	۱/۹, ۱/۷, ۱/۷	۳
	E۱۶۸	۱/۲, ۲			N۱۶۹	۱/۹	۱
K۲۵	E۱۶۸	۱/۸, ۲	۲				
R۲۷	E۱۴۱	۱/۸	۱				
	I۱۴۰	۲	۱				
	N۱۷۰	۱/۷	۱				



شکل ۸- نمودار ERRAT رسم شده از پروتئین ۳۳.

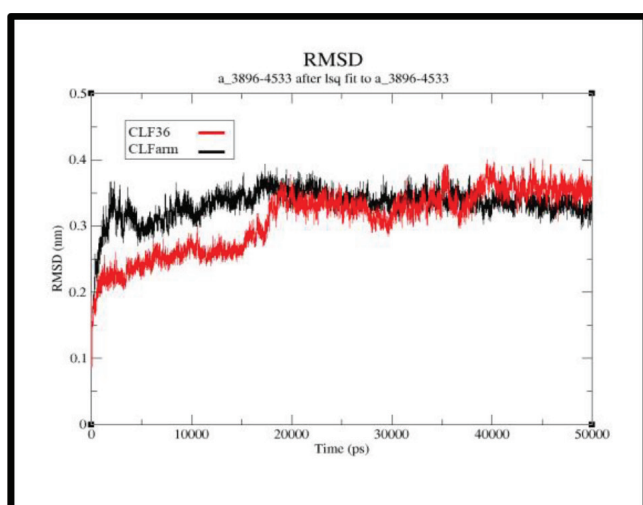
را با این نواحی داشته است؛ که تحرک پذیری کمتر آن‌ها نشان از پایداری بیشتر است.

باتوجه به اینکه شیب نمودار RMSD مربوط به پپتید CLF36 تغییراتی داشت، برای بررسی کردن میزان تحرک عناصر ساختاری آن چند میانگین‌گیری به ازای هراسید آمینه در فواصل زمانی ۱-۲۰ نانوثانیه و ۲۰-۴۰ و ۴۰-۵۰ نانوثانیه با استفاده از فلگ‌های -b (ابتدای زمان مورد آنالیز) و -c (انتهای زمان مورد آنالیز) در دستور RMSF صورت گرفت.

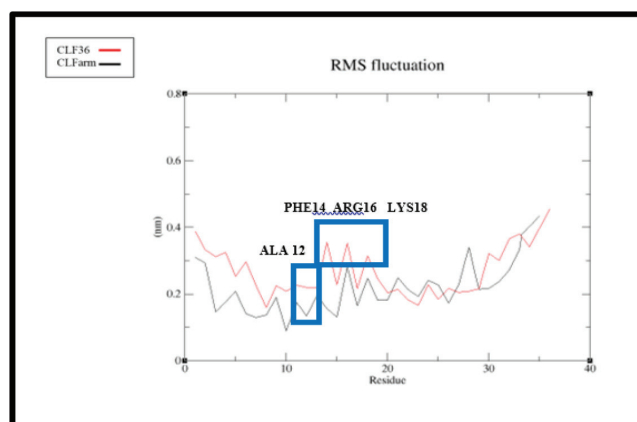
اسید آمینه‌های ARG16، PHE14 و LYS18 نوسانات بیشتری در حدود ۱/۰ nm را نسبت به CLFarm تجربه کردند. این اسیدهای آمینه مربوط به ناحیه‌ی لوپ هستند که نوسان و انعطاف‌پذیری در این ناحیه به طور طبیعی وجود دارد. همچنین مشاهده می‌شود تحرک‌پذیری در دو انتهای N و C ترمینال در هر دو پپتید نوسان و تحرک بیشتری را نشان دادند. محققین گزارش کردند نواحی آلفا هلیکس در این دو پپتید برای فعالیت ضروری هستند (۱۴) و نتایج داکینگ در این مطالعه نیز بیشترین اتصال

جدول ۳- پیوندهای هیدروژنی درگیر در برهمکنش CLF36 و CLFarm با رستپورهای سطح سلولی پروتئین P32.

داکینگ‌ها	پیوند هیدروژنی	طول پیوند	تعداد پیوند
CLF+۳۶UDP	Trp ۳۰	۲/۲۴	۱
CLF+۳۶ Heparin sulfate	Gln ۱۱	۲/۳۷	۱
	Trp ۴	۳/۱۵	۱
CLFarm+UDP	Trp ۳۰	۲/۶	۱
	Gln ۱۱	۳/۲	۱
CLFarm+ Heparin sulfate	Trp ۴	۲/۴۷	۱
	Trp ۳۰	۲/۶۱	۱
	Gln ۱۱	۲/۹۶	۱
	Arg ۲۷	۲/۹۶	۱
	Cys ۳۳	۲/۸۵	۱



شکل ۹- RMSD مربوط به پپتیدهای CLF36 و CLFarm با P32.



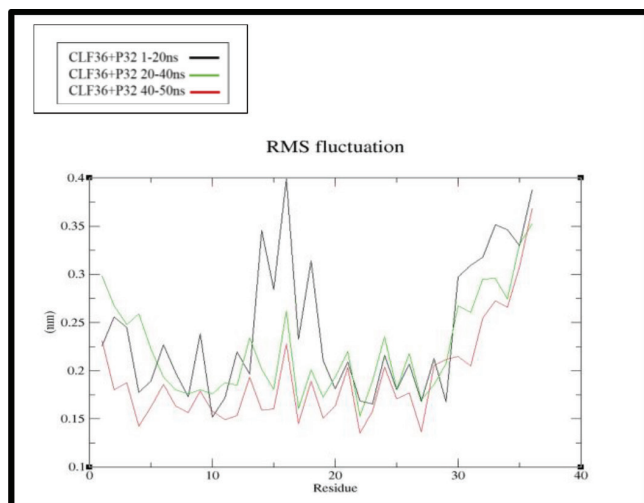
شکل ۱۰- RMSF مربوط به CLF36 و CLFarm با P32.

بلندتر باشد، سیستم بازتر و از حالت فولد به آنفولد تبدیل می‌گردد و احتمال شکستن پیوندهای هیدروژنی افزایش می‌یابد. مطابق با شکل ۱۳ با اتصال پپتید CLF۳۶ به پروتئین P۳۲، شعاع چرخشی از ۲۰ ns به بعد روند افزایشی دارد و سپس ثابت شد. در رابطه با CLFarm اگرچه در ابتدای شروع میزان شعاع چرخشی بیشتری را نسبت به CLF۳۶ نشان داد ولی در ادامه‌ی شبیه‌سازی روند کاهشی را نشان داده و در مقدار کمتری نسبت به CLF۳۶ ثابت گردید. به طور کلی، تغییرات فشردگی پپتیدها در طول دوره‌ی شبیه‌سازی نشان داد که تغییرات در پپتید CLFarm تاثیر مثبتی بر ثبات اتصالات دارد و نتایج قابل قبول‌تری را نشان داده و واکنش بهتری داشته است. شعاع چرخشی بالاتر ممکن است با کاهش مقاومت تعداد پیوندهای هیدروژنی مرتبط باشد که در ادامه به بررسی آن پرداخته شد.

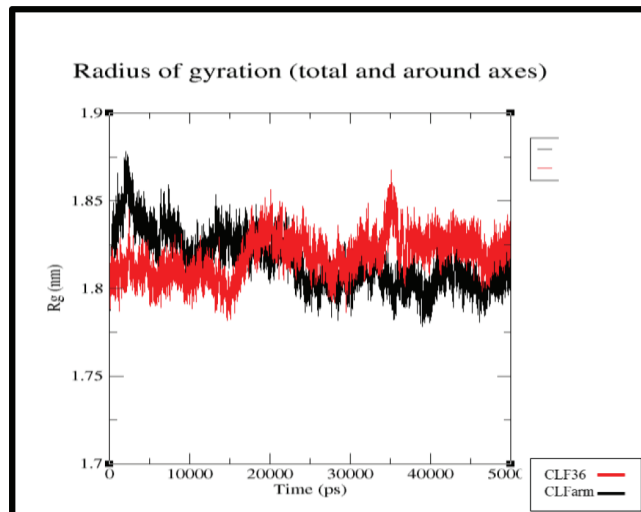
میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی میزان تمایل یک لیگاند را به رسپتور نشان می‌دهد. به عبارتی می‌توان گفت هر چقدر تعداد پیوندهای هیدروژنی و طول عمر آن‌ها بیشتر باشد، آن برهم کنش قوی‌تر می‌باشد (۱۳). در شکل ۱۳ نمودار مربوط به تعداد پیوندهای هیدروژنی نشان داده شده است. شیب نمودار پیوندهای هیدروژنی برای CLF۳۶ در مدت زمان ۲۰ نانوثانیه افت نشان داد که با نمودار RMSD آن هم‌خوانی دارد؛ سپس پس از کمی افزایش سیر نرمال و یکنواختی را تا انتهای دوره‌ی شبیه‌سازی نشان داد. شیب نمودار پیوندهای هیدروژنی برای CLF۳۶ رول نسبتاً یکنواختی را در طول دوره نشان داد. میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی برای CLF۳۶ و CLFarm در اتصال به پروتئین P۳۲ به ترتیب ۱۱/۳۸ و ۸/۴۸ گزارش شد. طول عمر پیوندهای هیدروژنی برای CLF۳۶ و CLFarm در اتصال به پروتئین P۳۲ به ترتیب ۵/۲۴ و ۵/۱۱ بود. با توجه به نوسانات در RMSD و RMSF پپتید CLF۳۶ میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی در مدت زمان‌های ۱-۲۰ و ۴۰-۵۰ نانوثانیه که نمودار RMSD

در بررسی نمودارها مشخص شد که نوسانات اسیدآمینه‌های ۱۶ تا ۱۸ در طی مدت زمان‌های ۱۰-۲۰ نانوثانیه، ۲۰-۴۰ نانوثانیه و ۴۰-۵۰ نانوثانیه در CLF۳۶ روند کاهشی نشان داد، اما میانگین کل دوره‌ها از CLFarm بالاتر بود. نوسانات سایر اسیدآمینه‌ها در این دو بازه زمانی تقریباً مشابه بوده است. مشابه با نتایج پاک نفس و همکاران (۱۳) اسیدآمینه‌ی ALA۱۲ که جایگزین GLU۱۲ در CLF۳۶ شده بود، میزان تحرک‌پذیری کمتری را در CLFarm نشان داد که می‌تواند به پایداری سیستم کمک کند. بنابراین مهندسی کردن ساختار CLF۳۶ توانست بر روی نوسانات RMSF موثر واقع گردد. پیرخضرانیان و همکاران (۱۴) نشان دادند که جایگزینی گلوتامیک اسید ۱۲ با آلانین و حذف سرین ۳۶ به طور همزمان در CLF باعث ایجاد قوی‌ترین و پایداری کمپلکس بین پپتیدهای مطالعه شده می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر جایگزینی گلوتامیک اسید ۱۲ با آلانین منجر به کاهش نوسانات پپتید مورد نظر در اتصال به P۳۲ شد؛ اما بنظر این اختلاف قابل توجه نمی‌باشد. همچنین محققین اظهار داشتند که تحرک در دو انتهای پپتید ضد میکروبی نسبت به بقیه قسمت‌ها بیشتر است؛ به عبارتی تغییرات RMSF در این نواحی افزایش دارد که محققین افزایش انعطاف‌پذیری را به اسیدآمینه آرژنین در این ناحیه نسبت دادند. این ویژگی از این بابت مهم است که نفوذپذیری پپتید از این ناحیه به درون غشا میکروارگانیسم صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ی حاضر نیز شاهد تحرک‌پذیری بیشتر اسیدهای آمینه در دو انتهای پپتید هستیم.

به منظور بررسی نتایج پایداری شبیه‌سازی بررسی شعاع چرخشی و پیوندهای هیدروژنی مورد ارزیابی واقع گردید. اندازه‌گیری فاصله نسبی هر اتم تا مرکز جرم پروتئین کار نسبتاً راحتی نمی‌باشد لذا بررسی شعاع چرخشی (Rg) به منظور بررسی فولدینگ و آنفولدینگ پروتئین‌ها معیار ارزشمندی است، به طوری که هرچه میزان افت و خیزها کمتر و کوتاه‌تر باشد، سیستم کروی‌تر و فولدتر بوده و هرچه افت و خیزها بیشتر و



شکل ۱۱- RMSF مربوط به CLF۳۶ + P۳۲ در بازه‌های زمانی مختلف.



شکل ۱۲- نمودار مربوط به شعاع چرخشی CLF۳۶ و CLFarm با P۳۲.

coli. *Scientific reports* 9(1), 1-9.

3. Hamdi, J., H. Munyanduki, K.O. Tadlaoui, M. El Harrak, and O.F. Fihri. 2021. Capripoxvirus infections in ruminants: A review. *Microorganisms* 9 (5): 1-16.

4. Hollingsworth, S. A., & Karplus, P. A. 2010. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. 271-283.

5. Hopker, A., Pandey, N., Saikia, D., Goswami, J., Hopker, S., Saikia, R., & Sargison, N. 2019. Spread and impact of goat pox ("sagolay bohonta") in a village smallholder community around Kaziranga National Park, Assam, India. *Tropical animal health and production* 51(4), 819-829.

6. Hurisa, T. T., Jing, Z., Jia, H., Chen, G., & He, X. B. 2018. A Review on Sheeppox and Goatpox: Insight of Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control Measures in Ethiopia. *Infectious disease epidemiology* 4(3), 2474-3658.

7. Kantwa, S. C., Mohanty, T. K., Patbandha, T. K., Layek, S. S., & Kumaresan, A. 2017. Disease Incidence and Mortality Pattern of Migratory Sheep Flocks in Marwar Region of Rajasthan, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 684-690.

8. Kumar, B. K., Kumar, K. M., Reddy, G. M., Abraham, S., Yogisharadhya, R., & Prashantha, C. N. 2020. Molecular Modelling and Insilico Engineering of PapMV-CP Towards Display and Development of Capripox Viral Like Particles Based on Immunogenic P32 Envelop Protein is the Homologous of the Vaccinia-Viral H3L Gene: An Insilico Approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26, 2155-2167.

9. Mirzaie, K., S.M. Barani, and S. Bokaie. 2015. A review of sheep pox and goat pox: Perspective of their control and eradication in Iran. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 2 (4): 373-381.

10. Mirzawi, R. 2020. Investigating the interaction of chimeric peptide cLF36 and engineered peptide cLF.arm with surface proteins LPXTG and LysM in *Corynebacterium bovis*. MSc thesis. Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad. Iran.

11. Mousavi, Z., Rashidian, Z., Zeraatpisheh, Y., & Javadmanesh, A. 2022. Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing *E. coli* antigen in cattle. *Veterinary Researches and Biological Products* 137: 115-123.

12. Nemaysh, V. and P. M. Luthra. 2017. Computational analysis revealing that K634 and T681 mutations modulate the 3D-structure of PDGFR- β and lead to sunitinib resistance. *RSC Advances* 7: 37612-37626.

13. Paknafs, A. 2019. In-silico investigation of CLF36 chimeric

دارای یک شیب بود مورد ارزیابی واقع شد. نتایج نشان داد که تعداد پیوندهای هیدروژنی در این مدت زمان ۱۰/۱۳ و ۱۱/۹۹ بود که با نتایج RMSD و RMSF همخوانی دارد و نشان می‌دهد به مرور زمان اتصالات پایدار شدند. به طور کلی CLF۳۶ تعداد پیوند هیدروژنی و طول عمر بالاتری را نشان داد. پاکنفس و همکاران (۱۳) نشان دادند که تعداد پیوند هیدروژنی در کمپلکس CLF۳۶ با OMPC ۵/۲۶ در طول مدت ۱۰۰ نانوثانیه می‌باشد. این محققین گزارش کردند که با افزایش زمان پیوندهای هیدروژنی گسسته شده و کاهش یافتند. میرزاوی و همکاران (۱۰) میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید CLFarm با LPXTG و LysM به ترتیب حدود ۲۵/۵ و ۲۲/۲ و تعداد پیوند هیدروژنی بین پپتید CLF۳۶ با LPXTG و LysM به ترتیب حدود ۲۴/۶ و ۲۱/۲ بود و این محققین نتیجه گرفتند که پپتید مهندسی شده در این بخش عملکرد خوبی را داشته است. نتایج این محققین برخلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. علت این تفاوت را می‌توان در کوتاه‌تر بودن مدت زمان شبیه‌سازی و تفاوت ویژگی‌های ساختاری و بار پروتئین P۳۲ در تعامل با پپتید گزارش کرد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش‌های محاسباتی مانند داکینگ مولکولی به بررسی برهمکنش بین پپتید CLF۳۶ و CLFarm با پروتئین P۳۲ ویروس آبله‌ی گوسفندی به منظور پیش‌بینی یک دارو جهت کنترل این ویروس پرداخته شده است. نتایج حاکی از آن بود که این دو پپتید قادر به اتصال به پروتئین P۳۲ و رسپتورهای این پروتئین بوده و نتایج قابل قبولی را ارائه دادند. درست است که CLF۳۶ تعداد پیوند هیدروژنی بیشتری را نشان داد اما اتصالات در CLFarm با P۳۲ در نواحی اپی توپی بیشتر بود. CLF۳۶ به طور ضعیف‌تری به رسپتورهای CLFarm متصل شده بود در حالیکه CLFarm اتصالات بهتری را نشان داد. با این تفاسیر اگرچه می‌توان پیش‌بینی کرد که هر دو پپتید بر روی ویروس آبله‌ی گوسفندی موثر هستند؛ اما قضاوت در مورد اینکه کدام پپتید بهتر عمل کرده است و می‌تواند اثر ضد ویروسی قوی‌تری را بر روی این ویروس داشته باشد نیازمند بررسی‌های آزمایشگاهی است که امید است در آینده بتوان این امر مهم را محقق ساخت.

پاورقی

1. Sheep pox virus.

منابع مورد استفاده

1. Beg, M., S. C. Thakur and L. S. Meena. 2018. Structural prediction and mutational analysis of Rv3906c gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv to determine its essentiality in survival. *Advances in Bioinformatics* 2018.
2. Daneshmand, A., Kermanshahi, H., Sekhavati, M. H., Javadmanesh, A., & Ahmadian, M. 2019. Antimicrobial peptide, CLF36, affects performance and intestinal morphology, microflora, junctional proteins, and immune cells in broilers challenged with *E.*

peptide and CLFARM engineered peptide binding to DnaK and OMPC proteins in Gram-negative bacteria. *MSc thesis*. Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad. Iran.

14. Pirkhezranian, Z., Tahmoorepur, M., Monhemi, H., & Sekhavati, M. H. 2020. Computational peptide engineering approach for selection the best engendered camel Lactoferrin-derive peptide with potency to interact with DNA. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(4), 2203-2212.

15. Pirovano, W., & Heringa, J. 2010. Protein secondary structure prediction. *Data Mining Techniques for the Life Sciences* 327-348.

16. Sahebnazar, A., Tahmoorepur, M., & Sekhavati, M. 2021. Molecular docking CLF36 peptide against avian influenza virus subtype H5N8 antigens. *Veterinary Researches & Biological Products* 34(4), 54-65.

17. Tahmoorepur, M., M. Azghandi, A. Javadmanesh, Z. Meshkat and M. H. Sekhavati. 2019. A novel chimeric anti-HCV peptide

derived from camel lactoferrin and molecular level insight on its interaction with E2. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 1-13.

18. Van der Kraan, M. I., van der Made, C., Nazmi, K., van 't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C., & Amerongen, A. V. N. 2005. Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides* 26 (11), 2093-2097.

19. Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson and Y. Zhang. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12: 7-8.

20. Zewdie, G., Derese, G., Getachew, B., Belay, H., & Akalu, M. 2021. Review of sheep and goat pox disease: current updates on epidemiology, diagnosis, prevention and control measures in Ethiopia. *Animal Diseases* 1(1), 1-10.

21. Zhang, Y. 2008. Progress and challenges in protein structure prediction. *Current opinion in structural biology* 18(3), 342-348.

