

## داکینگ مولکولی پپتید باکتریوسین انترووسین P با آنتی ژن سطحی باکتری اشرشیاکلای مولد ورم پستان در گاوشیری

• زهرا موسوی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• زهرا رشیدیان

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• یاسمن زراعت‌پیشه

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• علی جوادمنش (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۱-۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۱-۱۵

Email: javadmanesh@um.ac.ir



### چکیده

استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌هایی مانند ورم پستان گاوهای شیری ناشی از اشرشیاکلای، منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم شده است که تهدیدی برای سلامت عمومی قلمداد می‌شود. امروزه پپتیدهای ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌ها به‌عنوان عوامل بالقوه ضد میکروبی توجه بیشتری به خود جلب کرده‌اند؛ بنابراین بررسی پایداری و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها در شرایط بدن حیوان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. لذا، باهدف بررسی پایداری حرارتی پپتید انترووسین P (EntP)، ابتدا ساختار سوم EntP با استفاده از سرور I-TASSER پیش‌بینی شد. سپس، پایداری این ساختار در شرایط دینامیکی مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور شبیه‌سازی با کمک نرم‌افزار GROMACS در مدت زمان ۴۰۰ ns برای دمای طبیعی بدن گاوشیری (۳۱۲°K) صورت گرفت. در نهایت منحنی RMSD مربوط به این پپتید در مقایسه با زمان، در طول خط سیر شبیه‌سازی رسم گردید. به‌منظور بررسی برهم‌کنش پپتید با پروتئین لیپوپلی‌ساکارید سطحی D (LptD) از باکتری اشرشیاکلای مولد ورم پستان از سرور آنلاین ClusPro استفاده شد. در بخش آزمایشگاهی نیز حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) براساس روش میکروبراث بر روی اشرشیاکلای برآورد گردید. براساس نتایج گزارش شده توسط سرور I-TASSER، بهترین ساختار پیش‌بینی‌شده‌ی پپتید EntP با ضریب اطمینان (C-score) برابر با ۱/۴ انتخاب شد. مقادیر گزارش شده توسط پلات‌های ERRAT و Verify3D نشان داد که ساختار سوم پیش‌بینی‌شده برای پپتید EntP رضایت‌بخش است. گراف RMSD مربوط به بررسی پایداری حرارتی EntP در دمای بدن گاو نشان داد که ساختار پپتید EntP پس از مدت ۴۰۰ ns دارای خط سیر شبیه‌سازی پایدار است. نتایج مربوط به داکینگ مولکولی نیز نشان داد این پپتید به آنتی‌ژن LptD در موقعیت مناسب متصل می‌شود. میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به ترتیب ۴۸/۲۵ و ۹۶/۵ (µg/ml) برای باکتری اشرشیاکلای برآورد شدند. امید است در آینده بتوان از این پپتید به‌عنوان ترکیبی جایگزین آنتی‌بیوتیک یا در کنار آن به‌منظور درمان بیماری‌های دامی با منشا اشرشیاکلای استفاده کرد.

کلمات کلیدی: انترووسین، پپتید، بیوانفورماتیک، ورم پستان، داکینگ مولکولی

● Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 114-122

### Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing *E. coli* antigen in cattle

By: Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Rashidian, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Zeraatpisheh, Y., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Javadmanesh, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2022-02-01 Accepted: 2022-04-04

Email: javadmanesh@um.ac.ir

Excessive use of antibiotics to treat diseases such as mastitis in dairy cows caused by *Escherichia coli* has led to the emergence of antibiotic-resistant bacteria, which is considered a threat to public health. Nowadays, antimicrobial peptides such as bacteriocins have attracted more attention as potential antimicrobial agents. Therefore, the study of their stability and antibacterial activity in physiological conditions is very important. In order to investigate the thermal stability of Enterocin P peptide (EntP), the third structure of EntP was first predicted using the I-TASSER server. Then, the stability of this structure was evaluated by dynamic conditions for this purpose, the simulation was performed using GROMACS software in 400 ns at cow body temperature (312 °K). Finally, the root-mean-square deviation (RMSD) graph of this peptide was plotted against time along the simulation trajectory. ClusPro online server was used to study the interaction of peptide with LptD surface protein from *Escherichia coli* bacterium causing mastitis. In the in vitro phase of this study, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum dissociation concentration (MBC) of EntP peptide were estimated based on the microbroth method on *Escherichia coli*. The results showed that the best predicted structure of EntP peptide by I-TASSER server had a C-score of 1.4 which was selected. The values reported by the ERRAT and Verify3D plots indicated that the tertiary structure predicted for the EntP peptide was satisfactory. The RMSD graph related to the thermal stability of EntP at bovine body temperature showed that the structure of EntP peptide is stable after 400 ns of the simulation trajectory. The results of molecular docking also showed that this peptide was correctly attached to the LptD antigen. After measuring the MIC, the bacteria were cultured and the MBC was obtained, which were estimated at 48.25 and 96.5 µg/ml, respectively. This peptide could be used as an alternative to antibiotics or in combination with them for the treatment of infections with the origin of *Escherichia coli*.

Key words: EntP, Peptide, Bioinformatics, Mastitis, Molecular docking

### مقدمه

ورم پستان از جمله بیماری‌هایی است که منجر به کاهش کیفیت محصولات لبنی شده و از این طریق ضررهای اقتصادی قابل توجهی را به این صنعت وارد می‌کند (۲). این بیماری که بیشتر به دلیل درگیری با عوامل عفونی رخ می‌دهد به عنوان یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری در سراسر جهان شناخته می‌شود (۲). از جمله عوامل باکتریایی رایج مولد این بیماری می‌توان به استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای اشاره کرد که اشرشیاکلای باعث التهاب غدد پستانی در گاوهای شیری در هنگام زایمان و در اوایل شیردهی می‌شود (۱۳، ۷). یکی از راه‌های مرسوم درمان ورم پستان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست که استفاده بیش از حد و سوء از این ترکیبات منجر به ظهور باکتری‌های

مقاوم شده است که تهدید عمده‌ای برای سلامت عمومی قلمداد می‌شود (۱). از اینرو، جایگزین‌هایی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در حال بررسی هستند. امروزه پپتیدهای ضد میکروبی با منشأ طبیعی به عنوان عوامل بالقوه ضد میکروبی با عوارض جانبی جزئی توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که اثرات وسیع ضد میکروبی را در برابر باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها از خود نشان می‌دهند (۱۵، ۲۷، ۳۳). از جمله مزایای دیگر آن‌ها می‌توان به اثرات هم‌افزایی بین پپتیدها و آنتی‌بیوتیک‌های رایج، از بین بردن برخی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۳۰) و تمایل کم برای ایجاد باکتری‌های مقاوم به دارو اشاره کرد (۳۲). منشأ پپتیدها می‌تواند جانوری، گیاهی و یا حتی باکتریایی باشد. به عنوان مثال،

گرفته است (۱۵).

هدف از این مطالعه پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پپتید انتروسین باکتریوسین P، بررسی پایداری حرارتی آن در دمای ۳۱۲°K، داکینگ مولکولی این پپتید با پروتئین سطحی LptD باکتری اشرشیاکلای مولد ورم پستان و نیز بررسی حساسیت آزمایشگاهی این باکتری نسبت به پپتید انتروسین باکتریوسین می‌باشد.

### مواد و روش

#### بخش اول: بیوانفورماتیک

استخراج توالی اسیدآمینه‌ای پپتید EntP، پیش‌بینی و ارزیابی ساختار سوم این پپتید توالی اسیدآمینه‌ای پپتید EntP از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) با شماره دسترسی AB129856 به‌منظور پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی استخراج شد. ساختار سوم (سه‌بعدی) این پپتید با استفاده از نرم‌افزار (https://zhanggroup.org/I-TASSER) I-TASSER/پیش‌بینی شد. به‌منظور ارزیابی دقت و صحت پیش‌بینی و انتخاب بهترین ساختار سه‌بعدی، بهترین فایل‌های PDB حاصل از سرور I-TASSER، توسط سرورهای آنلاین SAVES (http://vadar.wishartlab.com/)، ProSA (https://prosa.services. و (https://saves.mbi.ucla.edu) v6.0) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ساختار سوم پروتئین LptD با کد دسترسی 4rhb از سرور RCSB (https://www.rcsb.org) گرفته شد.

#### بررسی پایداری پپتید در شرایط بدن گاو به کمک فرآیند دینامیک

##### مولکولی

پایداری ساختار سه‌بعدی پپتید EntP (منتخب از مرحله قبل) با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) و بر اساس دمای طبیعی بدن گاو شیری بررسی شد. بدین منظور از نرم‌افزار GROMACS نسخه ۵/۰/۱ (۲۱)، میدان نیرو GROMOS ۵۴aV (۱۶) و مولکول‌های آب E/SPC216 استفاده گردید. ملکول مورد مطالعه در مرکز یک جعبه مکعبی شبیه‌سازی بافاصله ۱ nm از هریک از دیواره‌ها و با شرایط periodic boundary قرار گرفت. خنثی‌سازی این سیستم با استفاده از یون‌های کلرید (بر اساس شرایط فیزیولوژیکی آن) انجام شد. انرژی الکترواستاتیک کل هر جعبه تناوبی با استفاده از روش جمع‌بندی (Particle Mesh Ewald) (PME) اندازه‌گیری و برهمکنش‌های غیرپیوندی (نیروهای الکترواستاتیک و واندروالس) نیز با استفاده از مدل لنارد-جونز با شعاع قطع ۱۰°A محاسبه شدند. کاهش انرژی سیستم با استفاده از الگوریتم steepest descent اجرا و با استفاده از الگوریتم کولپینگ Berendsen و ترموستات V-rescale، تنظیم NVT برای تعادل دما در ۳۱۲ درجه کلونین در طول شبیه‌سازی انجام شد. تعادل NPT در فشار ۱ بار و ۳۱۲ درجه کلونین (دمای طبیعی بدن گاو شیری) با استفاده از ثابت فشار Parrinello-Rahman و ثابت زمانی ۱ ps کنترل شد. در نهایت، شبیه‌سازی MD در ۴۰۰ ns و شرایط معادل انجام گردید. به‌منظور ارزیابی پایداری پپتید EntP، منحنی RMSD مربوط به پپتید در مقایسه با زمان در طول دوره شبیه‌سازی رسم شد.

باکتریوسین انتروسین P (EntP)، یک پپتید کاتیونی ۴۴ اسیدآمینه‌ای است که از باکتری *Enterococcus fascia* P۱۳ ترشح می‌شود (۱۸). محققان نشان داده‌اند که برخی از پپتیدها می‌توانند در برابر عوامل بیماری‌زا ورم پستان فعال باشد (۲۶). بنابراین، پپتیدها می‌توانند قابلیت استفاده به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک را داشته باشد (۳۱).

امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های محاسباتی برای پیش‌بینی ساختار پروتئین از توالی اسیدهای آمینه آن از اواخر قرن بیستم به وجود آمد. مقاله تحقیقاتی توسط آنفینسن در سال ۱۹۷۳ نشان داد که تمام اطلاعاتی که به تشکیل فولد صحیح پروتئین نیاز می‌باشد، در توالی اسیدهای آمینه آن رمزگذاری شده است (۳). در دو دهه گذشته تعداد ساختار پروتئین ثبت‌شده در هر دو سرور UniProt (۱۰) و Protein Data Bank (PDB) (۵) رشد زیادی را نشان داده است. به دست آوردن توالی‌های پروتئینی، بسیار ساده‌تر از به دست آوردن ساختار آن‌ها است. در حال حاضر پایگاه داده UniProt / TrEMBL بیش از ۸۵ میلیون توالی پروتئین دارد. در حال حاضر کریستالوگرافی X-ray و طیف‌سنجی NMR به‌عنوان روش‌های اصلی برای تعیین ساختار پروتئین‌ها در مقیاس آزمایشگاهی هستند. با این وجود، این دو روش زمان‌بر بوده و نیاز به نیروی آزمایشگاه دارند و همچنین برای اهداف مختلف پروتئینی محدودیت‌های فنی خود را دارا می‌باشند (۱۲). به‌طور کلی دو روش به‌منظور پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین طراحی شده است که شامل روش‌های مدل‌سازی با (همولوژی مودلینگ)/بدون الگو است. I-TASSER یک نرم‌افزار جامع پیش‌بینی ساختار مبتنی بر روش threading بوده که توسط آزمایشگاه Yang Zhang توسعه یافته است. کاربران می‌توانند توالی هدف خود را به سرور I-TASSER ارسال کنند یا بسته I-TASSER Suite را برای اجرا در رایانه‌های خود دانلود نمایند (۳۵). امروز با پیشرفت علم و پیدایش روش‌های بیوانفورماتیک نظیر داکینگ مولکولی به‌منظور پیش‌بینی برهم‌کنش اتصال پروتئین-لیگاند یا پروتئین-پروتئین با استفاده از ساختار و فعل و انفعالات الکترواستاتیک، زمینه برای پیدایش داروهای جدید تسریع شده است (۲۲). علاوه بر فعل‌وانفعالات Coulombic و تشکیل پیوندهای هیدروژنی، فعل‌وانفعالات واندروالی نیز در فرایند داکینگ نقش مهمی دارند. مجموع این فعل‌وانفعالات با یک امتیاز داکینگ مشخص می‌شود که نشان‌دهنده توانایی اتصال لیگاند به سوبسترا می‌باشد. از این روش به‌منظور بررسی برهم‌کنش بین پروتئین-لیگاند، پروتئین-پروتئین و پروتئین-DNA استفاده می‌کنند (۲۹). طی دو دهه گذشته، بیش از ۶۰ نرم‌افزار و سرور مختلف نظیر Haddock, ClusPro, Auto dock و سایر برای داکینگ ایجاد شده است که پیش‌بینی برهم‌کنش دو مولکول را در شرایط استاتیک مورد بررسی قرار می‌دهند (۲۹). به‌منظور بررسی ساختار پروتئین و داکینگ مولکولی در شرایط بدن موجود زنده از روش‌های دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزارهایی نظیر گرومکس استفاده می‌گردد (۱۲). باکتری‌های گرم منفی نظیر اشرشیاکلای در غشای بیرونی خود دارای ترکیبات لیپوپلی‌ساکاریدی مهمی هستند که از بیرونی‌ترین آن‌ها می‌توان به پروتئین‌های سطحی LptA و LptD اشاره کرد (۲۳). مطالعات بیوانفورماتیکی متعددی برای بررسی اثر پپتیدهای ضد میکروبی در فعالیت این قبیل پروتئین‌ها صورت

میکرودیلوشن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکر چرخشی قرار گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، کدورت در چاهک به صورت چشمی بررسی و سپس جذب نوری توسط دستگاه خوانشگر پلیت الیزا (STAT FAX ۲۱۰۰) در طول موج ۶۳۰ nm خوانده شد. در این آزمایش کنترل‌ها شامل کنترل مثبت (سوسپانسیون محیط کشت و باکتریایی به تعداد  $1 \times 10^8$  cfu/ml) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) بودند. در نهایت آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

#### حداقل غلظت کشندگی (MBC)

MBC حداقل غلظت کشندگی یک ترکیب به شمار می‌رود، بدین منظور از تمامی چاهک‌های فاقد کدورت مقدار  $10 \mu\text{l}$  در شرایط کامل استریل برداشته و بر روی محیط نوترینت آگار (NA) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، کمترین غلظتی از پپتید که هیچ‌گونه باکتری در آن رشد نکرده باشد، به عنوان MBC گزارش گردید. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه شد.

#### نتایج

##### مدل‌سازی و ارزیابی ساختار سوم پپتید EntP

ساختار سوم پیش‌بینی شده پپتید EntP توسط سرور I-TASSER با بیشترین میزان C-score برابر با ۱/۴ انتخاب شد (شکل A). C-score معمولاً در محدوده [۲ الی -۵] است، که C-score با اسکور بالاتر نشان‌دهنده مدلی با اطمینان بالاتر است و بالعکس (۳۵).

صحت پیش‌بینی ساختار سوم پپتید EntP در چندین گام ارزیابی شد. بر اساس پلات رامچاندان گزارش شده، ۹۰/۹٪ اسیدآمین‌های این ساختار

#### انجام داکینگ مولکولی

برهم‌کنش بین آنتی‌ژن سطحی LptD با پپتید EntP با استفاده از سرور آنلاین (ClusPro) (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) بررسی شد که در آن پپتید به عنوان لیگاند و آنتی‌ژن سطحی LptD به عنوان رسپتور در نظر گرفته شدند. در نهایت ساختارهای منتخب بر مبنای کمترین انرژی اتصال و جهت‌یابی صحیح به وسیله نرم‌افزار Pymol که یک نرم‌افزار کاربردی به منظور مشاهده پیوندهای هیدروژنی حاصل از داکینگ است، مورد بررسی قرار گرفتند.

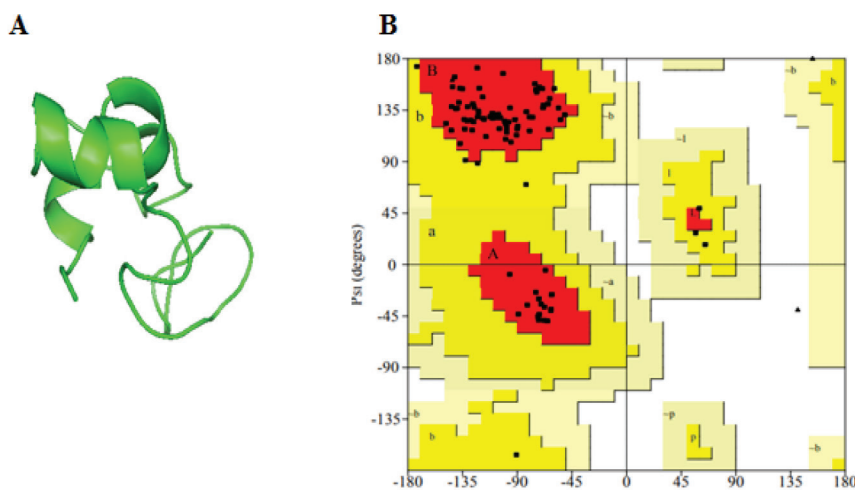
#### بخش دوم: آزمایشگاهی

باکتری اشرشیاکلاهی استحصال شده از بخش بیماری‌های دامی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد، ایران) تهیه و برای بررسی اثرات ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. پپتید انتروسین P از مطالعات قبلی در دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند (۲۴).

#### حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

مربوط به کمترین غلظت از هر ترکیبی است که در آن رشد پاتوژن مهار می‌شود. بنابراین، به منظور تعیین مقدار MIC، ابتدا  $100 \mu\text{g}$  میکرولیتر از محیط کشت نوترینت برات به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و  $100 \mu\text{g}$  میکرولیتر از پپتید EntP (حل شده در آب دو بار تقطیر) با غلظت  $921 \mu\text{g/ml}$  اولین چاهک در هر ردیف اضافه شد. پس از چند بار پیپت کردن به منظور مخلوط شدن کامل ترکیبات، تا چاهک ۱۱ رقیق‌سازی انجام گردید. در نهایت  $10 \mu\text{g}$  میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل

$1 \times 10^8$  cfu/ml به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. سپس پلیت

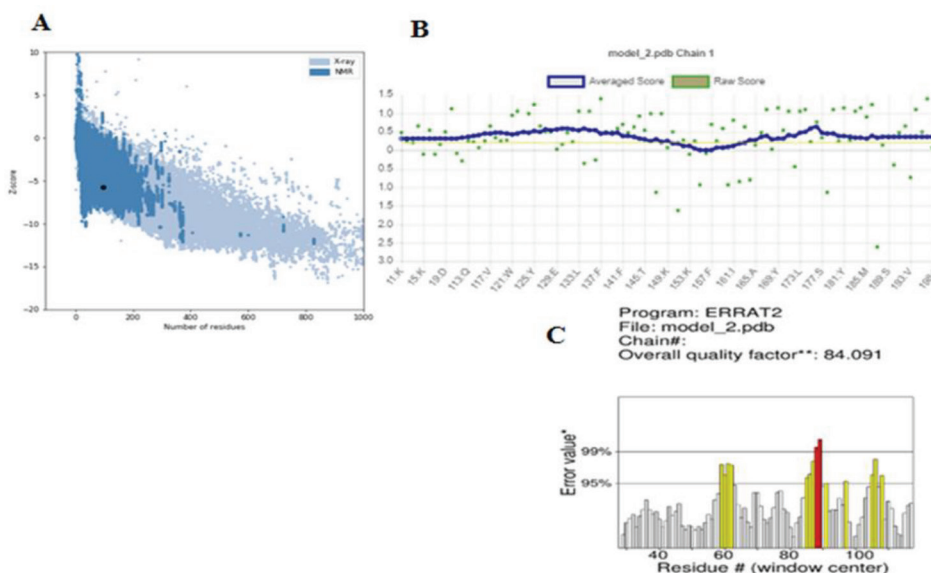


شکل ۱- A: ساختار سوم پپتید EntP پیش‌بینی شده توسط سرور I-Tasser با ضریب اطمینان ۱/۴. B: پلات رامچاندان مربوط به ساختار سوم پپتید EntP که نشان داده است که ۹۰/۹ درصد اسیدآمین‌ها در ناحیه مطلوب و ۹/۱ درصد اسیدآمین‌های باقی‌مانده در ناحیه مجاز واقع شده‌اند.

### نتایج بررسی دینامیک ملکولی پپتید EntP

بررسی دینامیک مولکولی این پپتید در دمای ۳۱۲ درجه کلون و به مدت ۴۰۰ نانوثانیه توسط نرم‌افزار GROMACS با موفقیت انجام شد. خط سیر نمودار RMSD آن نشان داد که ساختار این پپتید در طی ۴۰۰ نانوثانیه به پایداری رسیده است (شکل ۲). درزمینه‌ی پیکربندی اتم‌ها، نمودار RMSD معیاری برای واگرایی موقعیتی یک یا چند اتم است. RMSD، که به یک توصیفگر داخلی دینامیک پروتئین مربوط می‌شود، میانگین فاصله بین اتم‌های پیکره پروتئین‌ها را توصیف می‌کند. نمودار RMSD بر اساس اتم‌های کربن آلفای موجود در بدنه یک ترکیب، رسم می‌شود و نشان‌دهنده رفتار دینامیکی پایدار ساختارها است (۲۸). میزان تغییرات در RMSD کربن آلفا بهتر است که کمتر از ۲ آنگستروم باشد یا شیب نمودار RMSD بهتر است که صفر و یا نزدیک به صفر باشد تا ترکیب مورد مطالعه به‌عنوان یک ترکیب پایدار در نظر گرفته شود و هرچه نوسانات در طول تراژکتوری در نمودار RMSD و یا شیب این نمودار بیشتر شود ساختار ناپایدارتر خواهد بود و سریع‌تر متلاشی می‌شود همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، پپتید مورد مطالعه در دمای ۳۱۲ درجه کلون (دمای طبیعی بدن گاو) از ۲۰۰ نانوثانیه به بعد به کمترین میزان نوسان در نمودار RMSD رسیده است که تأییدکننده پایداری این پپتید در شرایط فیزیولوژیکی بدن گاو می‌باشد. نتایج مربوط به داکینگ مولکولی پپتید با آنتی‌ژن موردنظر در شکل

در ناحیه مطلوب، ۹/۱٪ اسیدآمین‌ها در ناحیه مجاز و ۰٪ اسیدآمین‌ها در ناحیه غیرمجاز واقع شده بودند که تأییدکننده پیش‌بینی صحیح ساختار سوم پپتید EntP می‌باشد (شکل B۱). علاوه بر این فایل PDB ساختار سوم پپتید EntP توسط نمودارهای به‌دست‌آمده از نرم‌افزارهای ProSA و ۷۵,۰ SAVES نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل A۲ نشان داده شده است، مقدار Z-score در نمودار به‌دست‌آمده از سرور ProSA برابر با ۵/۷۴- است. این نمودار با استفاده از Z-score زنجیره‌های پروتئین‌هایی که در پایگاه داده هستند (پروتئین‌های تجربی) ساخته شده است، اگر امتیاز گزارش شده برای پروتئین مورد مطالعه خارج از محدوده مشخصه برای پروتئین‌های وحشی با اندازه مشابه باشد، ساختار احتمالاً دارای خطاهایی است (۲۸). ولی همان‌طور که در شکل B۱ مشاهده می‌شود نقطه مشکی پررنگ در محدوده مجاز این نمودار قرار دارد. براساس مشاهدات موجود در نمودار ۳D Verify گزارش شده از سرور SAVES، ۸۶/۷۳ درصد از باقی‌مانده‌های اسیدآمین‌ها دارای میانگین نمره  $1D-3D < 0.2$  هستند (B۲) که بر اساس الگوریتم تعریف شده در این سرور اگر این شاخص بالاتر از ۸۰ باشد، برای پپتید مورد مطالعه قابل قبول است (۶). ERRAT یک سرور آنلاین است که ساختار سه‌بعدی پروتئین را بر فرض اتصال هسته‌ای بین اتم‌های مختلف تأیید می‌کند (۴) براساس الگوریتم طراحی این سرور ضریب کیفیت کلی ساختار پپتید EntP در این مطالعه ۸۴/۰۹۱ بوده که قابل‌قبول است (شکل C۲).



شکل ۲- A: نمودار Z-score به‌دست‌آمده از سرور ProSA مربوط به ساختار PDB پپتید EntP که با نقطه مشکی پررنگ نشان داده شده است. در این پلات موقعیت نقطه مشکی پررنگ در محدوده رنگی است. B: نمودار مربوط به Verify3D گزارش شده توسط سرور SAVE ۷۶,۰ که نشان می‌دهد بیش از ۸۰ درصد اسیدآمین‌های دارای میانگین نمره قابل قبولی برای حضور در ساختار سه‌بعدی پروتئین مدل شده دارند. D: نمودار ERRAT به‌دست‌آمده توسط سرور SAVE ۷۶,۰ که نشان می‌دهد فاکتور کیفیت کلی پروتئین مدل‌سازی شده بر اساس انواع مختلف اتم‌ها ۸۴/۰۹۱ است که این مقدار برای ساختار مورد مطالعه رضایت‌بخش می‌باشد.

باکتری را به خوبی نشان می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند، پپتید L<sup>4</sup>H<sup>4</sup>، با قرار دادن چهار توالی هیستیدین، فعالیت ضد باکتریایی و خواص نفوذ سلولی را نشان داد (۲۰). گروه گلیسین به‌طور کلی به‌عنوان یک آمینواسید غیرقطبی در زیست‌شناسی طبقه‌بندی می‌شود. AMP‌های غنی از گلیسین، مانند آتاسین‌ها و دیپتیرسین‌ها، به‌طور گسترده‌ای در طبیعت وجود دارند (۱۷، ۱۹). این پپتیدها حاوی ۱۴ تا ۲۲ درصد بقایای گلیسین هستند که تأثیر مهمی بر ساختار سوم زنجیره پپتیدها دارند. AMP غنی از گلیسین مکانیسم‌های میکروبی‌کشی با واسطه فاگوسیت‌ها را فعال می‌کنند، که با مکانیسم AMP‌های معمولی متفاوت است (۱۱). علاوه بر این، glycine-rich central-symmetrical GG<sup>3</sup> یک داروی تجاری ایده‌آل در برابر باکتری‌های گرم منفی بالینی است (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر ۱۵ درصد از پپتید EntP حاوی اسیدآمینوی گلیسین می‌باشد. برخی از پپتیدها

جدول ۱- آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی حاصل از داکینگ مولکولی پپتید EntP با آنتی ژن

سطحی LptD باکتری اشرشیاکلائی.

آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی	
پپتید	آنتی ژن
S5, Y6	N204
K16, N13	DV42
V10, M1	E282
R4	E201
C17	NV41
S38	Q283

۳ نشان داده‌شده است. بررسی‌ها نشان داد که این پپتید در موقعیت مناسب در تماس است. اسیدآمینوهای درگیر در ایجاد پیوند هیدروژنی از این پپتید در جدول ۱ مشخص شده‌اند.

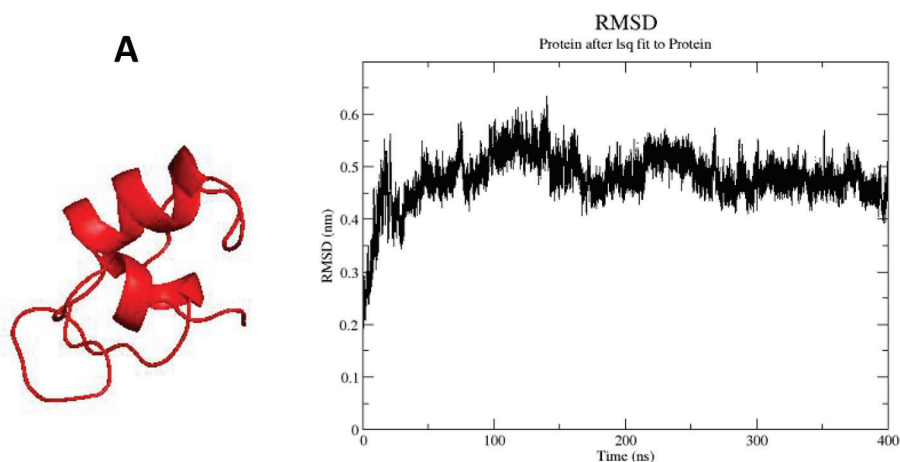
### نتایج بخش آزمایشگاهی

مقادیر MIC و MBC برای باکتری *E. coli* در برابر EntP مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب ۴۸/۲۵ و ۹۶/۵ (μg/ml) گزارش شد.

### بحث

هم‌راستا با مطالعه‌ی حاضر، جوادمنش و همکاران در سال ۲۰۲۱، به بررسی اثر دمای بدن گاو شیری و پرندگان بر ساختار فضایی پپتید کاتیونی تانائین از طریق دینامیک مولکولی در طول مدت ۱۰۰ نانوثانیه پرداختند. این محققین نشان دادند که نمودار RMSD برای این پپتید در هر دو شرایط با حفظ ساختار، پایدار شده است و این پپتید می‌تواند فعالیت خود را در این شرایط حفظ کند (۱۵). مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به پیش‌بینی ساختار این EntP در شرایط دینامیک و بدن حیوان انجام شده است.

در ارتباط با ترکیب اسیدآمینوی پپتیدها مطالعات مختلفی صورت گرفته است (۱۴). گزارش شده است که تریپتوفان (Trp)، به‌عنوان یک آمینواسید غیرقطبی، تأثیر قابل‌توجهی بر روی سطح دیواره باکتری دارد، درحالی‌که آرژینین (Arg)، به‌عنوان یک اسیدآمینو ضروری، مسئول بار پپتید و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی است که برای اتصال با دیواره‌ی آنیونی باکتری ضروری می‌باشد. به نظر می‌رسد که باقی‌مانده‌های تریپتوفان (Trp) نقش فعال‌کننده‌های آروماتیک طبیعی برای AMP‌های غنی از Arg را با فعل‌وانفعالات ion-pair- $\pi$  interactions ایفا می‌کنند، درنتیجه تعاملات پپتید-غشا را افزایش می‌دهند (۹). هیستیدین یک آمینواسید پایه‌ای است و AMP‌های غنی از هیستیدین فعالیت نفوذپذیری به



شکل ۳- A: ساختار سوم پپتید EntP بعد از انجام دینامیک مولکولی در دمای بدن گاو B: نمودار خط سیر RMSD مربوط به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتید EntP به مدت ۴۰۰ نانوثانیه در دمای ۳۱۲ درجه کلوین.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

### پاورقی ها

- 1 - Minimum inhibitory concentration.
- 2 - Minimum bactericidal concentration.
- 3 - Trajectory.
- 4 - Backbone.

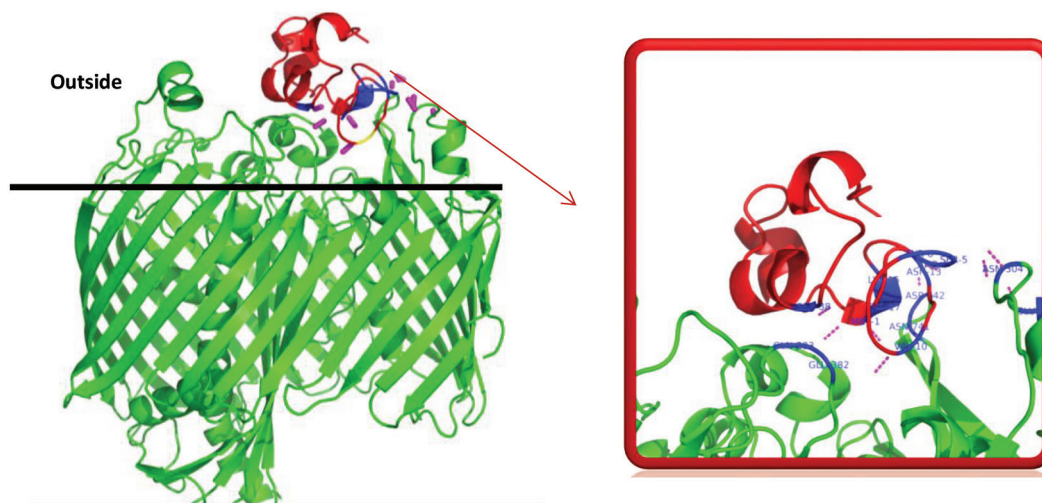
### منابع مورد استفاده

- 1- Abbaszadegan, A., A. Gholami, Y. Ghahramani, R. Ghareghan, M. Ghareghan, A. Kazemi, A. Iraj and Y. Ghasemi. 2016. Antimicrobial and cytotoxic activity of Cuminum cyminum as an intracanal medicament compared to chlorhexidine gel. *Iranian Endodontic Journal* 11: 44.
- 2- Aghamohammadi, M., D. Haine, D. F. Kelton, H. W. Barkema, H. Hogeveen, G. P. Keefe and S. Dufour. 2018. Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. *Frontiers in Veterinary Science* 5: 100.
- 3- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- 4- 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.

می‌توانند با بیش از یک سازوکار فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال کنند (۱۵، ۳۱). اثر متقابل و قابلیت اتصال انتروسین P به DNA، برای اولین بار توسط موسوی و جوادمنش بررسی شد (۲۵). این محققین نشان دادند که در حالت شبیه سازی، تمایل اتصال قابل توجهی بین انتروسین P و مولکول DNA وجود دارد که می‌تواند به عنوان یک سازوکار پیشنهادی، علاوه بر اثر افزایش نفوذ سلولی، در آزمایشات بعدی مورد توجه قرار گیرد. پپتیدها براساس ساختارشان به دسته‌های مختلفی تقسیم می‌شوند: پپتیدهای آلفا هلیکس، بتا شیت، ساختار گسترده خطی و ترکیب آلفا هلیکس و بتا شیت. محققین در مطالعه‌ای نشان داده‌اند کاهش فعالیت پپتید مصنوعی ۵(RLLR) تحت غلظت بالای نمک احتمالاً ناشی از تخریب ساختار آلفا هلیکس است، که نشان می‌دهد این ساختارها در فعالیت این قبیل پپتیدها مؤثر هستند. در این مطالعه EntP جز دسته‌ی پپتیدهای آلفا هلیکس می‌باشد که بخشی از پیوندهای هیدروژنی با آنتی‌ژن مورد مطالعه مربوط به این بخش می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده همان‌طور که در بخش بیوانفورماتیکی مهار باکتری توسط EntP نشان داده شد؛ در بخش آزمایشگاهی نیز این نتایج تأیید گردید.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج مربوط به این مطالعه نشان داد که این پپتید در شرایط بدن گاو پایدار بوده است. همچنین آنالیز داکینگ مولکولی نشان داد این پپتید به آنتی‌ژن LptD باکتری اشرشیاکلاهی در موقعیت مناسب متصل است. همچنین اثر کشندگی EntP بر باکتری اشرشیاکلاهی در شرایط آزمایشگاهی نیز نشان از اثربخش بودن این پپتید بر این باکتری دارد. امید است در آینده بتوان از این پپتید به عنوان ترکیبی جایگزین آنتی‌بیوتیک یا در کنار آن به منظور درمان برخی بیماری‌های عفونی استفاده کرد.



شکل ۴- اجرای داکینگ مولکولی پپتید EntP با آنتی‌ژن LptD از باکتری اشرشیاکلاهی توسط سرور ClusPro که با استفاده از نرم‌افزار Pymol رویت‌سازی شده است (پیوندهای هیدروژنی با رنگ بنفش و اسیدآمین‌های درگیر به رنگ آبی مشخص شده‌اند (پپتید EntP به رنگ قرمز و پروتئین LptD به رنگ سبز نشان داده شده است).

- 5- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235-242.
- 6- Bowie, J. U., R. Luthy and D. Eisenberg. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253: 164-170.
- 7- Burvenich, C., V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile and L. Duchateau. 2003. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary research* 34: 521-564.
- 8- Carugo, O. and S. Pongor. 2001. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science* 10: 1470-1473.
- 9- Chan, D. I., E. J. Prenner and H. J. Vogel. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1758: 1184-1202.
- 10- Consortium, U. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 43: D204-D212.
- 11- D'Este, F., M. Benincasa, G. Cannone, M. Furlan, M. Scarsini, D. Volpatti, R. Gennaro, A. Tossi, B. Skerlavaj and M. Scocchi. 2016. Antimicrobial and host cell-directed activities of Gly/Ser-rich peptides from salmonid cathelicidins. *Fish & Shellfish Immunology* 59: 456-468.
- 12- Deng, H., Y. Jia and Y. Zhang. 2018. Protein structure prediction. *International Journal of Modern Physics B* 32: 1840009.
- 13- Güler, L., Ü. Ok, K. Gündüz, Y. Gülcü and H. Hadimli. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* 88: 3149-3154.
- 14- Huan, Y., Q. Kong, H. Mou and H. Yi. 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology* 11: 2559.
- 15- Javadmanesh, A., E. Mohammadi, Z. Mousavi, M. Azghandi and A. Tanhaeian. 2021. Antibacterial effects assessment on some livestock pathogens, thermal stability and proposing a probable reason for different levels of activity of thanatin. *Scientific Reports* 11: 1-10.
- 16- Karplus, M. and J. A. McCammon. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology* 9: 646-652.
- 17- Kwon, Y., H. Kim, Y. Kim, Y. Kang, I. Lee, B. Jin, Y. Han, H. Cheon, N. Ha and S. Seo. 2008. Comparative analysis of two attacin genes from *Hyphantria cunea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 151: 213-220.
- 18- Le, T. N., T. H. Do, T. N. Nguyen, N. T. Tran, S. O. Enfors and H. Truong. 2014. Expression and simple purification strategy for the generation of anti-microbial active Enterocin P from *Enterococcus faecium* expressed in *Escherichia coli* ER2566. *Iranian Journal of Biotechnology* 12: 17-25.
- 19- Lee, J. H., K. S. Cho, J. Lee, J. Yoo, J. Lee and J. Chung. 2001. Dipterocin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene* 271: 233-238.
- 20- Lointier, M., C. Aisenbrey, A. Marquette, J. H. Tan, A. Kichler and B. Bechinger. 2020. Membrane pore-formation correlates with the hydrophilic angle of histidine-rich amphipathic peptides with multiple biological activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1862: 183212.
- 21- Maupetit, J., P. Derreumaux and P. Tufféry. 2010. A fast method for large-scale De Novo peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of computational chemistry* 31: 726-738.
- 22- Mohammadi, E. and A. Javadmanesh. 2019. Investigation of thermal-vulnerability of thanatin: an in silico study. *The 3rd International Congress on Biomedicine*.
- 23- Moura, E. C., T. Baeta, A. Romanelli, C. Laguri, A. M. Martorana, E. Erba, J.-P. Simorre, P. Sperandeo and A. Polissi. 2020. Thanatin impairs lipopolysaccharide transport complex assembly by targeting LptC-LptA interaction and decreasing LptA stability. *Frontiers in Microbiology* 11: 909.
- 24- Mousavi, S., S. Kazemi, M. Mahroughi and A. Tanhaeian. 2021. Evaluation of antibacterial activity and toxicity of enterocin P peptide and two essential oils against animal pathogens. *Veterinary Researches and Biological Products* 34: 48-54.
- 25- Mousavi, S., and A. Javadmanesh. 2022. Molecular docking of Enterocin-P peptide with DNA: an in silico study. Proceedings of the First International Conference and the 10th National Bioinformatics Conference of Iran. Abstract 313.
- 26- Mousavi, S., M. Tahmoorespoor, M. Sekhavati and A. Javadmanesh. 2018. Evaluation of antibacterial properties of camel lactoferrampin-lactoferricin recombinant peptide on the growth rate of *Staphylococcus aureus* bacteria causes of mastitis in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Microbiology* 37: 37-47.
- 27- Mousavi, S., Tanhaeian, A., and A. Javadmanesh. 2022. Evaluation of in vitro antifungal properties of Thanatin peptide and Chinaberry extract on fungal pathogen of bovine mastitis. *Veterinary Researches and Biological Products* 134: 215-221.
- 28- Nemaysh, V. and P. M. Luthra. 2017. Computational analysis revealing that K634 and T681 mutations modulate the 3D-structure of PDGFR- $\beta$  and lead to sunitinib resistance. *RSC Advances* 7: 37612-37626.



- 29- Pagadala, N. S., K. Syed and J. Tuszynski. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews* 9: 91-102.
- 30- Roshanak, S., F. Shahidi, F. T. Yazdi, A. Javadmanesh and J. Movaffagh. 2020. Evaluation of antimicrobial activity of Buforin I and Nisin and the synergistic effect of their combination as a novel antimicrobial preservative. *Journal of Food Protection* 83: 2018-2025.
- 31- Roshanak, S., F. Shahidi, F. T. Yazdi, A. Javadmanesh and J. Movaffagh. 2021. Buforin I an alternative to conventional antibiotics: Evaluation of the antimicrobial properties, stability, and safety. *Microbial Pathogenesis* 161(Pt B): 105301.
- 32- Shahidi, F., S. Roshanak, A. Javadmanesh, F. T. Yazdi, Z. Pirkhezranian and M. Azghandi. 2020. Evaluation of antimicrobial properties of bovine lactoferrin against foodborne pathogenic microorganisms in planktonic and biofilm forms (in vitro). *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 15: 277-283.
- 33- Tanhaeian, A., M. Azghandi, Z. Mousavi and A. Javadmanesh. 2020. Expression of thanatin in HEK293 cells and investigation of its antibacterial effects on some human pathogens. *Protein and Peptide Letters* 27: 41-47.
- 34- Wang, J., S. Chou, L. Xu, X. Zhu, N. Dong, A. Shan and Z. Chen. 2015. High specific selectivity and membrane-active mechanism of the synthetic centrosymmetric  $\alpha$ -helical peptides with Gly-Gly pairs. *Scientific Reports* 5: 1-19.
- 35- 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.

