اولین همایش ملی
کاربرد زیست سامانه‌ها و بیوانفورماتیک در علوم زیستی
دانشگاه جیرفت - ۱۳ آبان ۱۴۰۰

بررسی آسیب پذیری حرارتی پپتید باکتریوسین انتروسین در دمای بدن گاوشیری: مطالعه‌ی *In silico*

علی جوادمنش*[۱]، زهرا موسوی[۱]، منیره احمدیان[۱]، زهرا رشیدیان[۱]
۱- دانشگاه فردوسی مشهد
*آدرس پست الکترونیکی نویسنده مسئول: *javadmanesh@um.ac.ir*

چکیده

استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌هایی نظیر ورم پستان گاوهای شیری، منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم شده که به یک تهدید برای سلامت عمومی قلمداد می‌شود. امروزه پپتیدهای ضدمیکروبی نظیر باکتریوسین‌ها به عنوان عوامل بالقوه ضدمیکروبی توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند؛ که بررسی پایداری آن‌ها در شرایط بدن حیوان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. لذا، هدف از این مطالعه بررسی پایداری حرارتی پپتید انتروسین P (EntP) از طریق روش‌های بیوانفورماتیک با استفاده از نرم افزار GROMACS می‌باشد. ساختار سوم EntP با استفاده از نرم افزار I-TASSER پیش‌بینی شد. سپس، پایداری ساختار منتخب در شرایط دینامیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. شبیه‌سازی در مدت زمان ۳۰۰ ns برای دمای طبیعی بدن گاوشیری (312 K) انجام شد. در نهایت RMSD مربوط به پپتید در مقایسه با زمان در طول دوره شبیه سازی رسم گردید. نتایج نشان داد ساختار پیش بینی شده توسط I-TASSER با میزان C-score برابر با ۱/۴ انتخاب شد. نمودار RMSD حاصل از دینامیک مولکولی این پپتید پایداری را نشان داد. همچنین میزان ERRAT و Verify3D قابل قبول گزارش شد. RMSD مربوط پایداری حرارتی EntP در دمای بدن گاو نشان داد که پپتید EntP در ابتدا در دمای بدن گاوهای شیری پایدار نبوده است و پس از آن تا مدت ۳۰۰ نانوثانیه پایدار گردید که می‌تواند به کارایی این پپتید در این صنعت اشاره کرد. امید است در آینده بتوان از این پپتید بعنوان ترکیبی جایگزین آنتی بیوتیک یا در کنار آن بمنظور درمان بیماری‌های دامی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: EntP، پپتید، بیوانفورماتیک، ورم پستان

۱. 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 (آقا محمدی و همکاران، ۲۰۱۸). این بیماری که بیشتر به دلیل درگیری با عامل عفونی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلای* و *استرپتوکوکوس آگلاکتیه* رخ می‌دهد که بعنوان یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری در سراسر جهان شناخته می‌شود (گولر و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از راه‌های رایج درمان ورم پستان استفاده از آنتی بیوتیک‌هاست که استفاده بیش از حد و سوء از این ترکیبات منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم شده که به یک تهدید عمده برای سلامت عمومی قلمداد می‌شود (عباس زادگان و همکاران، ۲۰۱۵). از همین رو جایگزین‌هایی برای آنتی بیوتیک‌ها در حال بررسی هستند. امروزه پپتیدهای ضد میکروبی با منشا 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،

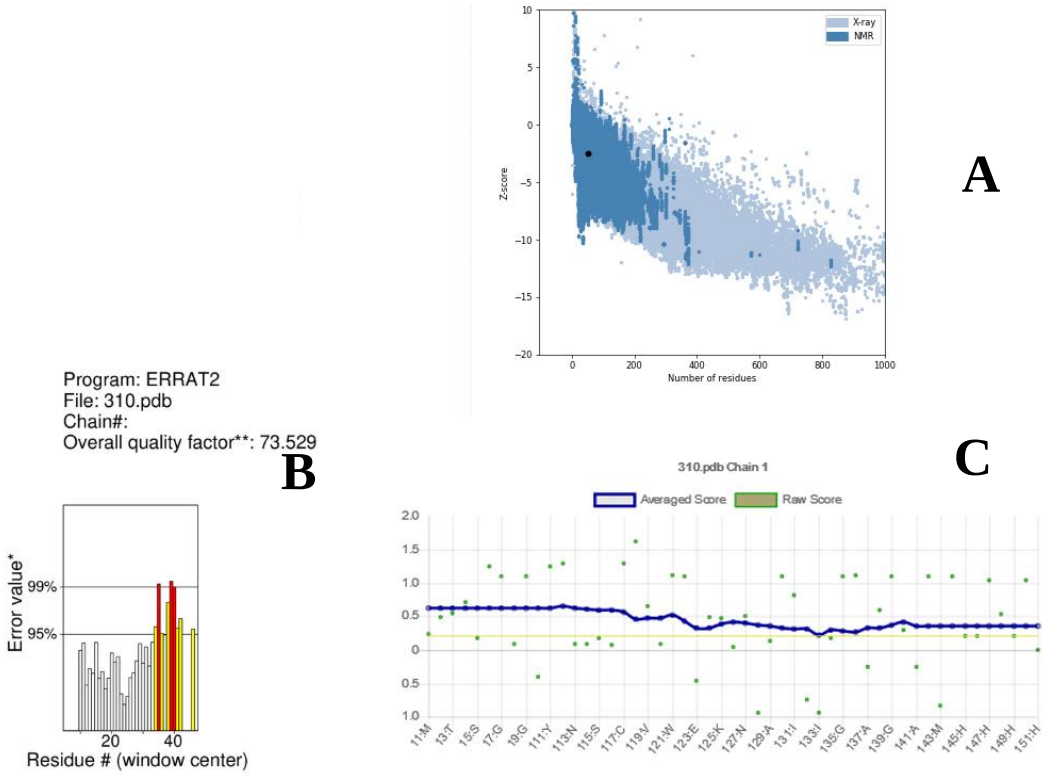
ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها از خود نشان می‌دهند (جوادمنش و همکاران، ۲۰۲۱). از جمله مزایای دیگر آن‌ها می‌توان به اثرات هم افزایی بین پپتیدها و آنتی بیوتیک‌های رایج ، از بین بردن برخی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک (روشنک و همکاران، ۲۰۲۰)، پتانسیل انتخابی بالا بین سلول‌های بیماری زا و میزبان با سمیت کم، تعدیل کننده های سیستم ایمنی و تمایل کم برای ایجاد باکتری‌های مقاوم به دارو اشاره کرد (شهیدی و همکاران، ۲۰۲۰). منشا پپتیدها می‌تواند جانوری، گیاهی و یا حتی باکتریایی باشد. به عنوان مثال، باکتریوسین انتروسین P (EntP) ، یک پپتید کاتیونی ۴۴ اسید آمینه است که از باکتری *Enterococcus fascia P13* ترشح می‌شود (لی و همکاران، ۲۰۱۴). محققان نشان داده‌اند که باکتریوسین می‌تواند در برابر عوامل بیماری زا ورم پستان فعال باشد (موسوی و همکاران، ۲۰۱۸). بنابراین، این پپتید می‌تواند قابلیت استفاده به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک را داشته باشد. بر این اساس، پایداری حرارتی پپتیدها در دماهای مختلف برای اهداف فرآوری دارویی می‌تواند به عنوان یک مزیت در نظر گرفته شود. استفاده از روش‌های *In silico* به منظور بررسی پایداری حرارتی پپتیدها راهی مناسب جهت افزایش سرعت مطالعات و کاهش هزینه‌ها می‌باشد (محمدی و جوادمنش، ۲۰۱۹). لذا، هدف از این مطالعه بررسی پایداری حرارتی پپتید EntP از طریق روش‌های *In silico* با استفاده از نرم افزار GROMACS تحت لینوکس می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

توالی اسیدآمینه‌ای پپتید EntP از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) با شماره دسترسی ABI29856 به منظور پیش‌بینی ساختار سه بعدی استخراج شد. ساختار سوم (سه بعدی) با استفاده از نرم افزار I-TASSER پیش‌بینی شد. بمنظور ارزیابی دقت پیش‌بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله در نرم‌افزار آنلاین SAVES v5.0 و ProSA مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس، پایداری ساختار منتخب در شرایط دینامیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. پایداری حرارتی EntP در برابر دماهای بالا در شرایط مختلف زمانی و حرارتی با شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) بررسی شد. شرایط دمایی با توجه به استفاده از این پپتید در صنعت دامپروری در نظر گرفته شد. بر این اساس، دمای طبیعی بدن گاو شیری اعمال شد. از نرم افزار GROMACS 5.0.1 (ماپتیت و همکاران، ۲۰۱۰)، میدان نیرو GROMOS 54a7 (کارپلوس و همکاران، ۲۰۰۲) مولکول‌های آب SPC/E و جعبه مکعبی با شرایط periodic boundary برای شبیه سازی MD استفاده شد. شبیه‌سازی در مدت زمان ۳۰۰ ns برای دمای طبیعی بدن گاو شیری انجام شد. در نهایت RMSD مربوط به پپتید در مقایسه با زمان در طول دوره شبیه سازی رسم شد.

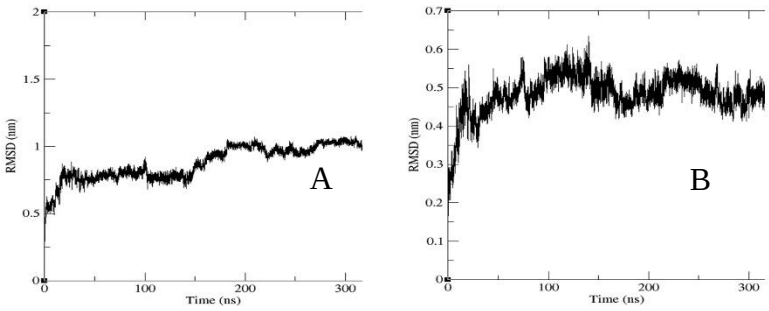
۳. نتایج

ساختار پیش بینی شده توسط I-TASSER با کمترین میزان C-score برابر با ۱,۴ انتخاب شد و دینامیک مولکولی برای آن در دمای 310 K به مدت ۳۰۰ نانوثانیه انجام شد. نمودار RMSD آن نشان داد که این پپتید در مدت زمان ۳۰۰ نانوثانیه متعادل شده است (شکل ۲). بررسی نمودارهای ERRAT و Verify3D با استفاده از نرم افزار save و z-score (۲,۴۴-) از طریق ProSA-web در شکل ۱ نشان داده شده است. مقادیر z-score در واقع به عنوان تقسیم انرژی بین ساختار اصلی و حالت misfolds در واحدهای انحراف استاندارد مشخص می‌شود که بهترین حالت برای آن عدد صفر می‌باشد. استراتژی Verify3D با استفاده از ساختار سه بعدی، پروتئین را ارزیابی می‌کند. این نمره از ۱- (نمره ضعیف) تا ۱+ (نمره خوب) متغیر است (بگ و همکاران، ۲۰۱۸). در شکل ۱ نشان می دهد که حداقل ۸۰ درصد از باقی مانده‌های اسید آمینه دارای میانگین نمره 3D-1D> = 0.2 هستند که برای پروتئین ما قابل قبول است. ERRATیک سرور آنلاین است که ساختار پروتئین را بر فرض اتصال هسته‌ای بین انواع مختلف اتم‌ها تأیید می‌کند (بگ و همکاران، ۲۰۱۸) که ضریب کیفیت کلی در این مطالعه ۷۳,۵۲ بوده که قابل قبول است.



شکل ۱. پیش بینی مدل ساختار سوم پپتید و اعتبار سنجی آن (A) نمودار z-score برای پیش بینی ساختار سه بعدی (B) نمودار مربوط به ERRAT (C) نمودار Verify3D

در شکل ۲ RMSD مربوط پایداری حرارتی EntP در دمای بدن گاو نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پپتید EntP در ابتدا در دمای بدن گاوهای شیری پایدار نبوده است و پس از آن تا مدت ۳۰۰ نانوثانیه پایدار گردید که می‌تواند به کارایی این پپتید در این صنعت اشاره کرد. امید است در آینده بتوان از این پپتید بعنوان ترکیبی جایگزین آنتی بیوتیک یا در کنار آن بمنظور درمان بیماری‌های دامی استفاده کرد.



شکل ۲. نمودار RMSD مربوط به شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتید EntP
A: RMSD مربوط به k ۳۱۰ B: RMSD مربوط به k ۳۱۲

دلایل استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در صنایع دامی به سه دسته تقسیم می شود: محرک رشد، پیشگیری از بیماری و درمان. متعاقباً تعداد باکتری های مقاوم به دارو نیز در اثر استفاده‌ی سوء از آنتی بیوتیک‌ها به عنوان چالش های بزرگ در بسیاری از کشورهای در حال توسعه در حال افزایش می‌باشد. از سوی دیگر، مسئله مقاومت آنتی بیوتیکی صنعت دامپروری را با مشکلات عظیمی، مانند ضررهای اقتصادی اثرات ناسالم بر انسان از طریق انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ها روبرو کرده است. استفاده از جایگزین‌های آنتی بیوتیکی مانند AMP ها یک برنامه ضروری است (جوادمنش و همکاران، ۲۰۲۱). این واقعیت که AMP ها در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، به عنوان مثال عوامل بیماری‌زای مقاوم در برابر چند دارو، باکتری‌های گرم مثبت و منفی فعالیت گسترده‌ای دارند، اثبات شده است. اینکه یک پپتید بتواند فعالیت خود را در شرایط بدن نیز حفظ کند یک مبحث چالش برانگیز می‌باشد. امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و پیش بینی ساختار پپتیدها و همچنین بررسی آن‌ها در شرایط دینامیکی کمک بزرگی را به جامعه‌ی علمی در جهت کاهش هزینه‌ها و تسریع در پژوهش کرده است. هم راستا با مطالعه‌ی حاضر جوادمنش و همکاران، ۲۰۲۱ به بررسی اثر دمای بدن گاو شیری و پرندگان بر ساختار فضایی پپتید کاتیونی تاناتین 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 (جوادمنش و همکاران، ۲۰۲۱). مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به پیش بینی ساختار این Enp در شرایط دینامیک و بدن حیوان انجام شده است.

۴. نتیجه‌گیری

این مطالعه پیش بینی کرد که پپتید Enp در شرایط بدن گاو می‌تواند فعالیت خود را حفظ کند که جهت تایید این نتایج نیاز به انجام بررسی های آزمایشگاهی می‌باشد.

منابع

1. Abbaszadegan, A., A. Gholami, Y. Ghahramani, R. Ghareghan, M. Ghareghan, A. Kazemi, A. Iraji 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. Beg, M., Thakur, S. C., & Meena, L. S. (2018). Structural prediction and mutational analysis of Rv3906c gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv to determine its essentiality in survival. *Advances in bioinformatics*, *2018*.
4. 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.
5. Javadmanesh, A., Mohammadi, E., Mousavi, Z., Azghandi, M., & Tanhaiean, A. (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), 1-10.
6. Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology*, *9*(9), 646-652.
7. 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.

8. Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2010). A fast method for large-scale De Novo peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of computational chemistry, 31*(4), 726-738.
9. Mohammadi E & Javadmanesh A. 2019. Investigation of thermal-vulnerability of thanatin: an in silico study. The Proceedings of The 3rd International Congress on BioMedicine. November the 10th, Tehran, Iran.
10. Mousavi, Z., Tahmoorespur., M, Sekhavati M.H., Javadmanesh A. 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, Volume 14, Issue 2
11. Roshanak S, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Javadmanesh A, Movaffagh J. Evaluation of Antimicrobial Activity of Buforin I and Nisin and Synergistic Effect of the Combination of them as a Novel Antimicrobial Preservative. J Food Prot. 2020 Jun 5. doi: 10.4315/JFP-20-127. Epub ahead of print. PMID: 32502264.
12. Shahidi F, Roshanak S, Javadmanesh A, Tabatabaei Yazdi F, Pirkhezraninan Z, Azghandi M. 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. DOI: 10.1007/s00003-020-01280-3