



A bioinformatics study of antibacterial peptide Attacin1a in *Tenebrio molitor*

Mohammad Hossein Karimi Gouraji¹, Mehdi Golestaninasab², Shakiba Darvish Alipour Astane¹

¹Department of Microbiology, Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan, Iran. ²Department of Biology, Faculty of Basic Science, Semnan University, Semnan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Nowadays, antimicrobial peptides produced from insects are considered for their antibacterial activity against pathogens and the fewer side effects. The aim of this study is a bioinformatics analysis of attacin1a as an antibacterial compound and the investigation of its physicochemical properties for laboratory research based on the production of drug delivery carriers and vaccine design.

Materials & methods: The sequence of attacin1a gene belonged to *T. molitor*, was extracted in FASTA format from the NCBI database; www.ncbi.nlm.nih.gov. The Molecular weight, similarity and physicochemical characteristics were investigated in the attacin1a and their homologous peptides. In addition, the second and tertiary structures of the attacin1a were predicted using bioinformatics software's, and the function and immunogenicity of the peptide were studied.

Results: Bioinformatics studies showed that the amino acid sequences of the attacin1a were conserved in the central and c-terminal regions between 10 members of the suborder Polyphaga. The assessment of structural and biochemical properties showed that the attacin1a structure contains 51% of non-polar amino acids with a disorder index of 61% and flexibility of 53%. The second structure of attacin1a consisted of 52.60% Random coils, 21.43% beta-strands and 21.43% alpha helices. The prediction of the tertiary structure in the Phyre2 showed 32% confidence and 31.1% identity to a beta-immunoglobulin protein (d2aw2a1). This peptide doesn't have a high ability to stimulate the immune system.

Conclusion: The abundance of beta strands in the attacin 1a structure increased the molecule's stability and its ability to cross through the cell membrane in bacteria.

Keywords: Antibacterial peptide, Attacin, Bioinformatics analysis, *Tenebrio molitor*.

Received: 9 June 2022

Revised: 13 August 2022

Accepted: 6 November 2022

Correspondence to: Mehdi Golestaninasab

Tel: +98 2331532298

E-mail: mgolestaninasab@semnan.ac.ir

Journal of Microbial World 2022, 15(3): 234-244

DOI:10.30495/jmw.2022.1958619.2020



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



مطالعه بیوانفورماتیک پپتید ضدباکتریایی آتاسین a1 از حشره *Tenebrio molitor*

محمد حسین کریمی گرجی^۱، مهدی گلستانی نسب^{۲*}، شکیبا درویش علیپور آستانه^۱

^۱گروه میکروبیولوژی، واحد سمنان، دانشکده بیوتکنولوژی، پردیس علوم و فناوری نوین، سمنان، ایران.

^۲گروه زیست شناسی، واحد سمنان، دانشکده علوم، سمنان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه پپتیدهای ضد میکروبی تولیدشده از حشرات به دلیل تاثیر ضد باکتری‌های بیماری‌زا با اثرات جانبی کمتر، مورد توجه هستند. هدف از این مطالعه، بررسی خواص فیزیکی-شیمیایی آتاسین a1 به‌عنوان ترکیب ضدباکتریایی برای انجام پژوهش‌های آزمایشگاهی بر پایه‌ی تولید حامل‌های دارورسانی و طراحی واکسن، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش توالی ژن کدکننده پپتید ضد میکروبی آتاسین a1 تولید شده از حشره *T. molitor*، از پایگاه داده NCBI، با نشانی www.ncbi.nlm.nih.gov، در فرمت FASTA دریافت شد. وزن مولکولی، میزان مشابهت و تفاوت میان توالی‌های آتاسین a1 با سایر پپتیدهای همولوگ، و مشخصات فیزیکی-شیمیایی مولکول بررسی گردید. همچنین ساختار دوم و شکل فضایی پپتید آتاسین a1، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک پیشگویی و میزان عملکرد و ایمنی‌زایی پپتید مطالعه شد.

یافته‌ها: توالی آمینواسیدی پپتید آتاسین a1، با پپتیدهای مشابه در ۱۰ عضو از زیر راسته Polyphaga، در نواحی مرکزی و انتهایی (c-ترمینال) مشابه است. ویژگی‌های ساختاری و بیوشیمیایی آتاسین a1، ۵۱٪ آمینواسیدهای غیرقطبی با شاخص بی‌نظمی ۶۱٪ و انعطاف‌پذیری ۵۳٪ را نشان می‌دهد. ساختار دوم آتاسین a1، شامل ۵۲/۶۰٪ پیچ‌های تصادفی، ۱/۴۳٪ صفحات بتا و ۲۱/۴۳٪ ماریپج آلفا است. پیشگویی ساختار سوم در پایگاه Phyre2، ۳۲٪ هم‌پوشانی و ۳۱/۱٪ اعتبارسنجی به پروتئین متعلق به بتا شبه‌ایمونوگلوبولین (d2aw2a1) را نشان می‌دهد. این پپتید توانایی بالایی در تحریک سیستم ایمنی ندارد.

نتیجه‌گیری: فراوانی صفحات بتا در ساختار آتاسین a1، دلیلی بر پایداری مولکول و افزایش توانایی آن در عبور از غشای سلولی باکتری‌ها است.

واژگان کلیدی: آتاسین، آنالیز بیوانفورماتیک، پپتید ضدباکتریایی، *T. molitor*.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۲۰

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۹

مقدمه

به منظور ترشح و ورود به سلول هدف برای تاثیرگذاری مهم است. همچنین اغلب این ترکیبات دارای بار مثبت هستند که اتصال خودکار آن‌ها به غشای سلولی را تسهیل می‌کنند (۳ و ۱). این ترکیبات، به دلیل خواص ضد ویروسی و ضد سرطانی در شرایط درون‌تنی، عوارض جانبی کم و توانایی تخریب بیوفیلیم، به‌عنوان یک جایگزین آنتی‌بیوتیک مورد توجه هستند (۴ و ۲).

پپتیدهای ضد میکروبی در طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها تولید و در طی تکامل حفظ شده‌اند. اندازه کوچک این ترکیبات (۱۰ تا ۱۰۰ آمینواسید)، برای عبور از غشای سلول تولیدکننده

* آدرس برای مکاتبه: دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
تلفن: ۰۲۳۳۱۵۳۲۲۹۸
پست الکترونیک: mgoleshtaninasab@semnan.ac.ir



مسیر پیام‌رسانی Toll/IMD و در نهایت رونویسی از ژن آتاسین می‌شود. آتاسین به صورت یک Pre-pro-protein، دارای پپتید نشانه، موتیف حفاظت شده RXXR به همراه دو دومین G1 و G2 است که در انتهای آمین، غنی از گلیسین است. در نهایت با حذف پپتید نشانه و دومین‌های G1 و G2، پروتین عملکردی به صورت ۲۰ تا ۲۳ کیلودالتونی به همولنف ترشح می‌شود (۷ و ۹ و ۱۳).

آتاسین، به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی غنی از گلیسین در حشره *Tenebrio molitor* شناسایی گردید. این حشره به‌عنوان یک منبع غذایی برای تغذیه حیوانات آزمایشگاهی، دام و طیور استفاده می‌شود و حتی در سال‌های اخیر به شکل فرآوری شده وارد چرخه غذایی انسان نیز شده است. مطالعات و شناخت بیشتر پپتید ضد میکروبی استخراج شده از حشره *T. molitor*، به این دلیل حائز اهمیت است که با وارد شدن مستقیم حشره در چرخه غذایی دام، طیور و آبزیان و یا به‌عنوان مکمل هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، برای افزایش بازده عملکرد پپتید، در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرد (۱۲). هدف از این پژوهش، مطالعه بیوانفورماتیک آتاسین a1 به‌عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی و بررسی خواص فیزیکی-شیمیایی آن به صورت طبیعی است. به‌عبارتی بررسی جنبه‌های ایمنی‌زایی پپتید در میزبان انسان می‌تواند به انجام پژوهش‌هایی برپایه‌ی تولید حامل‌های دارورسانی و طراحی واکسن کمک کند.

مواد و روش‌ها

الف) مطالعات بیوانفورماتیک پپتید آتاسین a1، از حشره *Tenebrio molitor*: در ابتدا، توالی ژن‌های کدکننده پپتید آتاسین a1، از حشره *Tenebrio molitor* متعلق به خانواده Tenebrionidae با شماره بانک ژنی MF754109.1 از پایگاه داده NCBI، با نشانی www.ncbi.nlm.nih.gov، با فرمت FASTA دریافت شد. برای یافتن پپتیدهای مشابه با درصد همولوژی بالا نسبت به توالی هدف در سایر حشرات از BLASTP برای داده‌های Non-redundant protein sequence

پپتیدهای ضد میکروبی، ملانین، ترکیبات فعال اکسیژن و نیتروژن به همراه هموسیت‌ها مجموعاً ایمنی ذاتی حشرات را تشکیل می‌دهند (۶ و ۵). بر اساس نوع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای وارد شده به بدن میزبان، انواع مختلفی از پپتیدهای ضد میکروبی با استفاده از مسیرهای متفاوت درون سلولی در توده چربی و هموسیت‌ها تولید و به همولنف ترشح می‌شوند که از نظر ساختاری به چهار گروه پپتیدهای α -helical مانند سکروپین و مورسین، پپتیدهای غنی از سیستین مانند دیفنسین و دروزوماسین، پپتیدهای غنی از پرولین مانند دروزوسین و آپیدائسین و پپتیدهای غنی از گلیسین مانند آتاسین و گلوورین تقسیم می‌شوند. مکانیسم اثر این ترکیبات به صورت تخریب غشای زیستی با سه الگوی پیش‌بینی شده مشترک شامل مدل Toroidal، Barrel stave و Carpet است. در صورت مناسب بودن غلظت پپتیدهای ضد میکروبی، آمینواسیدهای قطبی به گروه‌های فسفات و آمینواسیدهای غیرقطبی به گروه‌های لیپیدی غشای پلاسمایی اتصال یافته و سبب تغییر شیب الکتروشیمیایی، کاهش پتانسیل غشا، تغییر شکل و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۹ و ۱۰). این نوع اتصال به سطح اسفنگومیلین، فسفاتیدیل کولین/کلسترول خنثی در غشای پلاسمایی جانوران که دارای اجزای ساختاری غشای سلولی یوکاریوتی متفاوت با پروکاریوت‌ها می‌باشند، ضعیف است و سبب عدم تأثیرگذاری و یا تقلیل اثرات تخریبی این نوع ترکیبات بر روی سلول‌های غیر از میکروارگانیسم مهاجم می‌شود (۳ و ۱۰). باکتری‌های گرم منفی مانند *شریشیا کلی* و یا برخی از باکتری‌های گرم مثبت سبب القای مسیر نقص ایمنی (IMD)، باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها سبب القای مسیر Toll و همچنین با تولید سایتوکاین‌ها در هر یک از مسیرهای فوق، مسیر پیام‌رسانی JAK/STAT القا می‌شود و در نتیجه ممکن است یک یا چند نوع مختلف از پپتیدهای ضد میکروبی تولید و ترشح شوند (۱۱). در مورد آتاسین، شناسایی الگوهای وابسته به باکتری‌های بیماری‌زا مانند لیپوپلی ساکاریدها، تیکوئیک اسید و لیپوتیکوئیک اسید و در بعضی از گرم مثبت‌ها نظیر *باسیلوس سوبتیلیس* و *لیستریا مونوسایتوژنز*، سبب القای

انجام گرفت (۳۰ و ۳۱). با انتخاب بهترین ساختار پیش‌بینی شده بر مبنای امتیاز Z، شیمی فضایی پروتئین بر اساس داده‌های نمودار رامچاندران، پایگاه داده Ramachandran Plot قابل دسترس در <https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/index.pl> بررسی گردید. پس از گزینش بهترین ساختار، هم‌ترازی ساختارهای اول، دوم و سوم با پروتئین‌های نزدیک به ساختار مورد نظر از پایگاه داده Dali قابل دسترس در <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/> و با استفاده از مولفه‌های پیش‌فرض این پایگاه مطالعه شد. وجود این پایگاه داده از این جهت دارای اهمیت است که می‌توان به صورت همزمان هم‌ترازی پروتئین‌های پیش‌بینی شده را از نظر ساختارهای اول، دوم و سوم بررسی کرد (۳۲).

آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده پروتئین از نظر قطبیت، سطحی بودن و میزان انرژی کل با استفاده از مولفه‌های پیش‌فرض پایگاه داده InterProSurf به آدرس اینترنتی <http://curie.utmb.edu/prosurf.html> مورد بررسی قرار گرفت.

اپی‌توپ‌های خطی و فضایی پروتئین به وسیله پایگاه‌های داده SVMTriP قابل دسترس در آدرس <http://sysbio.unl.edu/> SVMTriP (۳۳)، پایگاه داده CBTOPE قابل دسترس در <http://crdd.osdd.net/raghava/cbtope/submit.php> (۳۴) و پایگاه داده Ellipro به آدرس <http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro> بررسی گردید (۲۳). در تمام موارد با استفاده از مولفه‌های پیش‌فرض پایگاه داده‌ها، مطالعات انجام گرفت.

یافته‌ها

الف) مطالعات بیوانفورماتیک پپتید آتاسین a۱ از حشره *Tenebrio molitor*: هم‌ترازی توالی نوکلئوتیدی پپتید آتاسین a۱ از حشره *T. molitor*، با پپتیدهای هم‌ریف شده در پایگاه داده NCBI که دارای امتیاز بالاتر از ۰/۵ هستند، توسط پایگاه داده PRALINE انجام گرفت. این هم‌ترازی به صورت امتیازدهی به هر آمینواسید نسبت به سایر توالی‌ها بدست آمد که بالاترین امتیاز دارای رنگ قرمز و پایین‌ترین امتیاز دارای

(nr) در پایگاه داده NCBI استفاده شد (۲۴). برای بررسی میزان مشابهت و تفاوت بین توالی‌های آتاسین a۱ با سایر پپتیدهای همولوگ در پایگاه داده NCBI، هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از سرور PRALINE قابل دسترس به نشانی <https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww> با استفاده از مولفه‌های پیش‌فرض سرور انجام گرفت. این هم‌ترازی برای بررسی میزان حفاظت‌شدگی از نظر امتیاز نهایی در پروتئین‌های مشابه است (۲۵).

وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، فرمول خطی، ترکیب اسیدهای آمینه‌ی تشکیل‌دهنده، تعداد اسیدهای آمینه‌ی باردار مثبت و منفی، نیمه‌عمر پپتید مورد نظر، با استفاده از مولفه‌های پیش‌فرض پایگاه داده ProtParam قابل دسترس در <http://expasy.org/tools/protparam.html> بررسی گردید (۳۵ و ۱). برای مطالعه وجود پپتید نشانه از مولفه‌های پیش‌فرض پایگاه SignalP 4.0 قابل دسترس در <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP> و ساختار دوم پپتید آتاسین a۱، از سرور SOPMA بدون تغییر مولفه‌های پیش‌فرض با نشانی https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html (۲۱ و ۲۲).

ب) مطالعات ایمونوآنتیجنتیک آتاسین a۱: اپی‌توپ شکلی در ساختار سوم بر میزان تحریک‌پذیری سلول‌های B موثر است. بنابراین با پیشگویی شکل فضایی پروتئین با کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، میزان عملکرد و ایمنی‌زایی آن قابل ارزیابی است. پیش‌بینی ساختار سوم با استفاده از سرورهای زیر و بدون تغییر در مولفه‌های پیش‌فرض بررسی گردید:

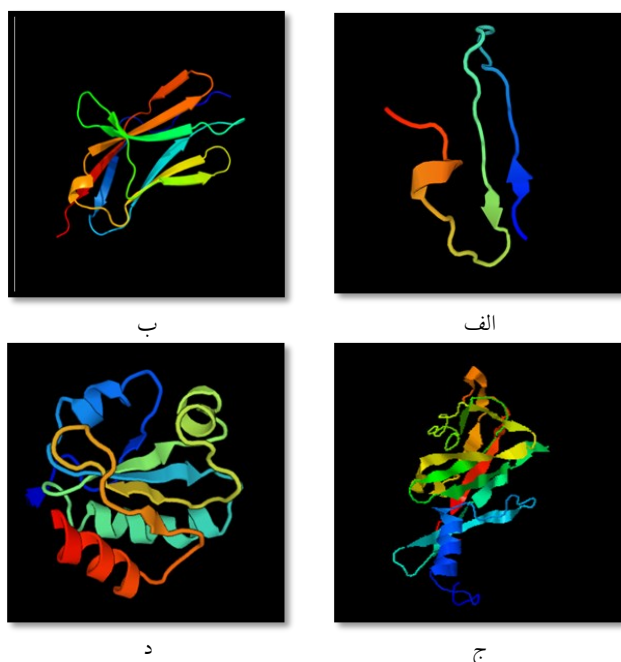
I-TASSER: <https://zhanggroup.org/I-TASSER> (۲۸ و ۳۶)

SWISS-MODEL: <https://swissmodel.expasy.org> (۲۶)

Phyre2: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2> (۲۷)

SPARKS-X: <https://sparks-lab.org> (۲۹)

مطالعه بهترین ساختار با کمک سرورهای PROSA و Qmean با مولفه‌های پیش‌فرض که به ترتیب در آدرس <http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php> و <http://swissmodel.expasy.org/qmean> قابل دسترس هستند،



شکل ۱: ساختارهای سوم پیش‌بینی شده برای پپتید آتاسین a1 در هر یک از پایگاه‌های داده (الف) SEISS-MODEL، (ب) Phyre²، (ج) I-TASSER، (د) SPARKS-X براساس استانداردهای ارائه شده مانند امتیاز Z و C.

همچنین نتایج حاصل از داده‌های مربوط به پایگاه Qmean براساس دو مولفه QMEAN4، QMEANDisCo به ترتیب با مقادیر ۱/۵۷- و ۰/۰۷ برای مدل 4xhma نیز تایید گردید. این ساختار در منطقه مناسب از نظر امتیاز Z در نمودار ارائه شده در این پایگاه قرار گرفته است (شکل ۲). داده‌های حاصل از آنالیز پایگاه Ramachandran Plot برای مدل 4xhma به صورت ۱۰۷ آمینواسید در ناحیه مجاز (۹۸/۱۶۵٪)، ۲ آمینواسید در ناحیه قابل قبول (۱/۸۳۵) و فاقد آمینواسید در ناحیه غیرمجاز نمایش داده می‌شود.

پس از انتخاب مدل 4xhma، نزدیکترین پروتین‌ها به آن بر اساس هم‌ترازی ساختارهای اول، دوم و سوم، توسط پایگاه داده Dali3D مشخص گردید. سپس پپتیدهای پیشگویی شده، براساس بیشترین تشابه در امتیاز Z از امتیاز ۲۲/۵ (بیشترین امتیاز) تا امتیاز ۱۸ مقایسه شدند (جدول ۱). توالی آمینواسید آتاسین a1 در مدل 4xhma با پپتید Thioredoxin در پایگاه Dali و Praline هم‌ردیف شدند. نتایج نشان‌دهنده تشابه بالا در توالی آمینواسیدی ۶۲ تا ۱۵۴ است. علاوه بر توالی آمینواسید، هم‌ردیفی ساختار دوم پپتید Thioredoxin نیز بررسی شد.

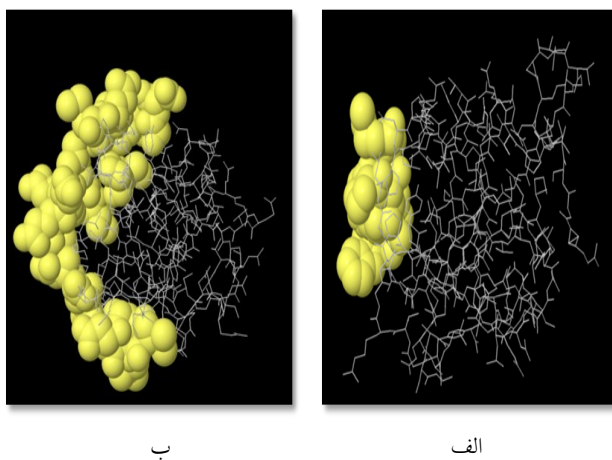
رنگ آبی گزارش شد. هم‌ترازی توالی‌های بدست آمده برای آتاسین a1، نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی توالی آمینواسیدی در محدوده ۴ تا ۶۶، ۷۱ تا ۱۴۳، ۱۷۰ تا ۱۹۴، ۲۰۶ تا ۲۰۹، ۲۱۸ تا ۲۳۷ و ۲۶۴ تا ۲۶۹ می‌باشد.

با توجه به اینکه پپتیدهای ضد میکروبی نظیر آتاسین ترشح شده به همولنف، دارای توالی نشانه هستند، آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده این نوع توالی با استفاده از پایگاه داده Signalp در محدوده آمینواسید ۱ تا ۲۰ است. ساختار دوم آتاسین a1 در پایگاه داده SOPMA، شامل ۵۲/۶۰ درصد پیچ‌های تصادفی، ۲۱/۴۳ درصد صفحات بتا و ۲۱/۴۳ درصد مارپیچ آلفا پیش‌بینی شد و پیشگویی ساختار سوم برای پپتید آتاسین a1، با استفاده از پایگاه‌های داده انجام گرفت. در پایگاه SWISS-MODEL بهترین ساختار پیش‌بینی شده از نظر مقدار همپوشانی ۰/۳۶ و تشابه توالی ۰/۲۵ به پروتین همودایمر 2x3a.1.A که به یک اندوپپتیداز خارج سلولی سمی تعلق دارد (شکل ۱-الف). برای پایگاه Phyre2 بهترین ساختار پیش‌بینی شده دارای همپوشانی ۳۲ و اعتبارسنجی ۳۱/۱ درصد متعلق به پروتین بتا شبه ایمونوگلوبولین با نام d2aw2a1 می‌باشد (شکل ۱-ب). در مورد پایگاه I-TASSER بهترین ساختار پیش‌بینی شده بر اساس امتیاز C با مقدار عددی ۳/۳۶- تعیین شد. این امتیاز بین بازه ۲ تا ۵- متغیر است که بهترین ساختار دارای امتیاز C بالاتری می‌باشد. مدل پیشنهادی به علت داشتن کوچکترین عدد منفی بین مدل‌های دیگر در کنار درصد تطابق ۰/۲۵، همپوشانی او امتیاز Z ۰/۶۹ با عنوان مدل سوم (model_3) گزینش گردید (شکل ۱-ج). در نهایت بهترین ساختار از نظر پایداری و سطح انرژی از پایگاه داده SPARKS-X با امتیاز Z ۱۹/۶۵ و درصد تطابق ۳۱/۵ (4xhma) تعیین شد (شکل ۱-د). آنالیزهای مرتبط با تعیین کیفیت ساختار سوم بر اساس امتیاز Z از سطح انرژی آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده در ساختار سوم پیش‌بینی شده در نمودار NMR و X-ray، در پایگاه PROSA انجام گرفت. بهترین ساختار در این پایگاه توسط پایگاه SPARKS-X، مربوط به مدل 4xhma (شکل ۱-د)، پروتین (THIOREDOXIN (TRX-3) است.

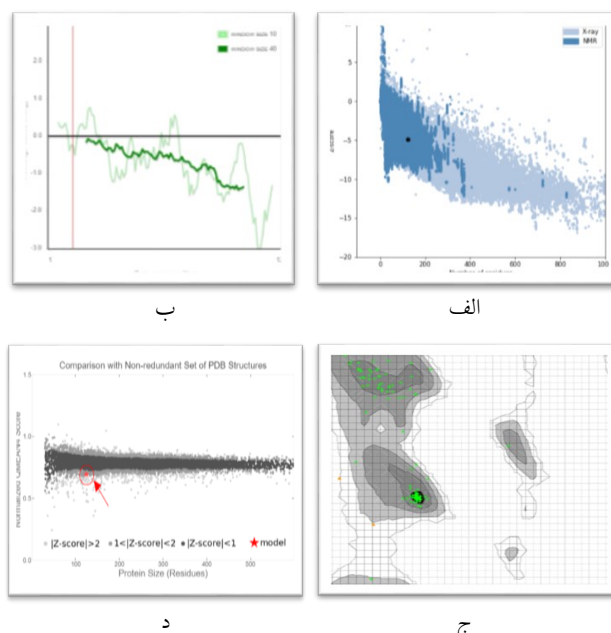
ب) مطالعات ایمونونفورماتیک آتاسین a1: آنالیز توالی آمینواسید، توسط پایگاه داده Ellipro، در جدول ۲ شامل اپی توپ‌های خطی و فضایی است که بر اساس امتیاز اختصاصی مرتب شده‌اند. دیگر پایگاه داده مورد استفاده CBTOPE بود که نتایج آنالیز به صورت امتیاز دهی ۰ تا ۹ ارائه می‌شود. عدد ۹ در آنالیز این پایگاه نشان‌دهنده بیشترین احتمال اپی توپ است. علاوه بر وجود اپی توپ‌های خطی و فضایی در سطح پروتین، اپی توپ‌های شکلی در درون ساختار پپتید مورد مطالعه، توسط پایگاه داده SVMTrip پیش‌بینی گردید. محل قرار گرفتن هر یک از اپی توپ‌ها در ساختار سه‌بعدی آتاسین a1 در شکل ۳ نشان می‌دهد آتاسین a1 توانایی بالایی برای تحریک سیستم ایمنی ندارد.

جدول ۲: بررسی احتمال وجود اپی توپ خطی و فضایی پپتید آتاسین a1 توسط پایگاه‌های داده CBTOPE, Ellipro, SVMTrip.

امتیاز	توالی آمینواسید	اپی توپ	پایگاه داده
۵	۱۰۴ تا ۹۲ GDTSLGVQAENIQ	اپی توپ خطی پروتین	CBTOPE
۱	۱۳۱ تا ۱۱۲ AEATRNLKDKRKSLLDVGVN	اپی توپ داخلی پروتین	SVMTrip
۰/۷۴۶	۵۲ تا ۴۴ ADWCGPCQM	اپی توپ خطی پروتین	Ellipro
۰/۶۴۹	A44, D45, W46, C47, G48, P49, Q51, M52, V88, P89, V104, G105, L106, Q107, D108, A111, D114, E117, S118, T120, E121, L122, V123	اپی توپ فضایی پروتین	Ellipro



شکل ۳: الف) جایگاه اپی توپ خطی پیش‌بینی شده دارای بالاترین امتیاز. ب) محل اپی توپ‌های شکلی دارای بالاترین امتیاز در ساختار سه‌بعدی آتاسین a1 از *T. molitor* در پایگاه داده Ellipro.



شکل ۲: الف) موقعیت مدل 4xhmA در نمودار NMR و X-ray توسط پایگاه داده PROSA. ب) نمودار سطح انرژی آمینواسید در مدل 4xhmA (ج) موقعیت مدل 4xhmA بر اساس امتیاز Z ساختار سوم پیش‌بینی شده در بین پپتیدهای با امتیاز Z متفاوت توسط پایگاه داده Qmean. د) بررسی ساختار سوم پیش‌بینی شده از نظر تعداد آمینواسید مجاز در نمودار رامچاندوران از پایگاه داده Zlab. در این نمودار مناطقی که با رنگ مشکی، خاکستری تیره، خاکستری مشخص شده است مناطق بسیار مطلوب از نظر کونفورماسیون زوایای ϕ و ψ و مناطق سفید با خط مشکی مطلوب و مناطق سفید با خطوط شطرنجی خاکستری رنگ مناطق نامطلوب است. آمینواسیدهای بسیار مطلوب به صورت صلیب سبزرنگ، آمینواسیدهای مطلوب به صورت صلیب نارنجی و آمینواسیدهای نامطلوب به صورت آمینواسیدهای قرمز رنگ در نمودار مشخص می‌شوند.

جدول ۱: هم‌ردیفی ساختارهای اول، دوم و سوم پروتین آتاسین a1، بر اساس بهترین مدل پیشنهادی (4xhm-A) در پایگاه داده Dali3D.

شماره	زنجیره	امتیاز Z	درصد تطابق	توصیف
۱	4xhm-A	۲۲/۵	۳۲	MOLECULE: THIOREDOXIN (TRX-3)
۲	4xhm-B	۲۱/۳	۳۳	MOLECULE: THIOREDOXIN (TRX-3)
۳	2cvk-A	۱۹/۱	۳۹	MOLECULE: THIOREDOXIN
۴	2yzu-A	۱۸/۹	۳۹	MOLECULE: THIOREDOXIN
۵	2o7k-A	۱۸/۵	۴۰	MOLECULE: THIOREDOXIN
۶	3ziv-C	۱۸/۰	۳۸	MOLECULE: AECA THIOREDOXIN

بحث

شاخص پپتیدهای ضد میکروبی، مبنی بر آبگریز بودن، این پپتید را قادر می‌سازد از سمت غیرقطبی بین دولایه غشای پلاسمایی و از طرف آمینواسیدهای قطبی با گروه‌های فسفات غشای دولایه فسفولیپیدی، به صورت پایدار میان‌کنش دهد (۱۷و۲). در مورد اکثر پپتیدهای ضد میکروبی، وجود صفحات بتا در ساختار دوم، به خصوص در مورد پپتید آتاسین a1، بر اساس نتایج بدست آمده، وجود درصد بالایی از رشته‌های گسترده و صفحات بتا، پایداری و تثبیت پپتید را افزایش داده و عبور از عرض غشای پلاسمایی را تسهیل می‌کند (۱۷).

آتاسین a1 به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی غنی از گلايسين، در توده چربی و هموسیت حشره *T. molitor* تولید و به همولنف ترشح می‌شود. پپتید نشانه که برای ترشح این پپتید ضروری است در ترکیب H pre-pro-آتاسین a1 وجود دارد. مطابق با نموداری که در پایگاه داده SignalP ارائه شده، خط چین سبز رنگ که نشانه سیگنال پپتیداز است، نشان می‌دهد که برش توالی نشانه در موقعیت آمینواسید ۲۰ است. پپتید نشانه به دلیل دارا بودن ساختار مارپیچ آلفا منطقه هلیکس (منطقه h) را تشکیل می‌دهد (۱۸). ساختارهای سوم که توسط چهار پایگاه داده I-TASSER، SWISS-MODEL، Phyre2، SPARKS-X و I-TASSER پیشگویی و در ادامه بر پایه امتیاز Z ۴/۹۳- ارزیابی گردید و با توجه به آنالیزهای پایگاه داده‌ها، بهترین ساختار سوم از پایگاه‌های داده Phyre2 و SPARKS-X انتخاب شد. به دلیل هم‌ترازی بهتر آتاسین a1 با توالی آمینواسیدی در مدل SPARKS-X نسبت به Phyre2، ساختار سوم پیش‌بینی شده توسط این پایگاه داده، برای بررسی بیشتر انتخاب شد. این هم‌ترازی بهتر نه تنها در مورد توالی آمینواسیدی، بلکه در مورد ساختار دوم نیز توسط پایگاه داده Dali3D به طور هم‌زمان انجام و نتایج آن توسط پایگاه PRALINE نیز تایید گردید.

یکی از مهمترین مراحل در طراحی دارو، شناسایی اپی‌توپ‌های القاکننده‌ی سیستم ایمنی است که توسط سلول‌های ایمنی شناسایی می‌شوند. با توجه به خطای آزمایشگاهی، هزینه بالای طراحی آزمایش در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی، مصرف مواد

مطالعه ویژگی‌های ساختاری و بیوشیمیایی پپتیدهای ضد میکروبی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک، به محققان برای بررسی اثر این ترکیبات بر روی سلول هدف در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی کمک فراوانی می‌کند. حشرات حدود ۷۵ درصد از گونه‌های جانوری را شامل می‌شوند و استفاده از آن‌ها در درمان بعضی از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های پوستی در چین باستان و امروزی، هندوستان و آفریقا رواج دارد. از جمله این مواد می‌توان به کانتاریدین اشاره کرد که از سوسک‌های تاول‌زای متعلق به *Meloidae* و *Oedemeridae* تولید و باعث تاول پوستی می‌شود. از کانتاریدین و مولکول‌های مشابه برای درمان هاری، زگیل و ناتوانی جنسی استفاده می‌شود. اولین پپتید ضد میکروبی، سکروپین، توسط بومن و همکاران در سال ۱۹۸۰ از همولنف حشره *Hyalophora cecropia* شناسایی شد و زمینه را برای مطالعات دقیق بر روی ترکیبات استخراج شده از حشرات که جنبه درمانی داشتند، فراهم کرد. در سال‌های اخیر، مطالعات محققان زیادی بر روی پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده توسط سیستم ایمنی حشرات متمرکز شده است (۱۴و۱۵).

با توجه به تنوع بالا در ترکیبات ضد میکروبی حشرات، تشابه ساختاری و توالی آمینواسیدی در اکثر پپتیدها مشاهده می‌شود. پپتید آتاسین از نظر pH به دو گروه تقسیم می‌شود. گروه آتاسین‌های بازی که شامل آتاسین A تا D و گروه آتاسین‌های اسیدی که شامل آتاسین‌های E و F می‌باشند. با توجه به اینکه این دو گروه توسط دو ژن مجزا کد می‌شوند، تفاوت آن‌ها در آمینواسید اسپاراتات است که دارای تعداد بیشتری گروه اسیدی است. در بررسی هم‌ردیفی پروتین نسبت به آتاسین a1، هم‌ترازی توالی آمینواسیدی پروتین‌های دارای امتیاز بالا، نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی در توالی آمینواسید ۶۰ تا ۱۵۴ (حدود ۸۰ درصد تشابه) بود که ممکن است این تشابه در انواع پپتیدهای آتاسین در *T. molitor* و یا یک پپتید آتاسین در انواع حشرات متفاوت باشد. با توجه به آنالیزهای پایگاه داده Protparam، پپتید ضد میکروبی آتاسین a1، همانند ویژگی

ضدباکتریایی مشخص کرد که فراوانی صفحات بتا در ساختار آتاسین a1، دلیلی بر پایداری مولکول و افزایش توانایی آن در عبور از غشای سلولی باکتری‌ها است. با در نظر گرفتن این نکته که ترکیب مورد نظر قادر به تحریک سیستم ایمنی در میزبان انسان نیست، می‌تواند به انجام پژوهش‌هایی برپایه‌ی تولید حامل‌های دارورسانی و طراحی واکسن کمک کند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان انجام گرفت.

تعارض منافع

وجود ندارد.

اولیه و از دست رفتن مدل‌های آزمایشگاهی، شناسایی اپی‌توپ‌ها و پیش‌بینی ساختارشان با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک آسانتر است.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های القاکننده سیستم ایمنی شامل اپی‌توپ‌های خطی و فضایی که توسط سلول‌های T و B شناسایی می‌شوند از طریق پایگاه‌های داده Ellipro و SVMTrip انجام گرفت. این اپی‌توپ‌ها به صورت سطحی بوده و در مراحل اولیه ورود توسط سیستم ایمنی میزبان شناسایی می‌شوند. اپی‌توپ‌های شکلی از طریق پایگاه داده CBTOPE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پیشگویی نرم‌افزار نشان می‌دهد آتاسین a1 توانایی بالایی برای تحریک سیستم ایمنی ندارد و بنابراین به‌عنوان یک ترکیب جایگزین آنتی‌بیوتیک می‌تواند در آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گیرد. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت دارویی، استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی بدون بررسی‌های تکمیلی به منظور افزایش بازده اثر آن‌ها، به تنهایی کافی نیست و بعضی از تغییرات به منظور افزایش کارآمدی ترکیبات ضد میکروبی اعمال می‌شوند. از این تغییرات می‌توان به جهش‌زایی تصادفی، رابطه ساختار-فعالیت کمی (QSAR)، تغییر ساختار پپتید به واسطه حلقوی شدن ساختار، افزایش بار یا آگریزی به وسیله برچسب زدن اشاره کرد که در مواردی چون PL-5 (یک A پپتیدهای ضد میکروبی دارای ساختار مارپیچ آلفا)، POL7080 (یک پپتید ضد میکروبی سنتز شده به صورت حلقوی)، پپتید کاتیونی DPK060، بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی در مراحل آزمایشی و بالینی مورد استفاده قرار گرفت. به‌عبارتی در عصر جدید، طراحی ترکیبات جدید به دلیل محدودیت‌های منابع مالی و زمانی، نیازمند بررسی‌های بیوانفورماتیکی می‌باشند.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش روز افزون مقاومت دارویی، مطالعه پپتیدهای ضد میکروبی و بررسی‌های تکمیلی بر روی ساختار آن با هدف افزایش بازده اثر آن‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک ضروری است. بررسی بیوانفورماتیک آتاسین a1 و خواص فیزیکی- شیمیایی آن به صورت طبیعی، به‌عنوان یک ترکیب

References

1. Liao YY, Zuo YH, Tsai CL, Hsu CM, Chen ME. cDNA cloning and transcriptional regulation of the cecropin and attacin from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), Arch. Insect Biochem. Physiol. 2015; 89(2):111-26.
2. Manniello MD, Moretta A, Salvia R, Scieuzo C, Lucchetti D, Vogel H, Sgambato A, Falabella P. Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. Cell. Mol. Life Sci. 2021;78(9):4259-82.
3. Muthuirulan P, Paramasamy G, Jeyaprakash R. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. Int. J. Pept. 2013; 23935642.
4. Ntwasa M, Goto A, Kurata S. Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. Int. J. Microbiol. 2012; ID 101989.
5. Kim SG, Jo YH, Seong JH, Park KB, Noh MY, Cho JH, Ko HJ, Kim CE, Tindwa H, Patnaik BB, Bang IS. TmSR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2017;1: 89:31-42.
6. Rosales C, Vonnice S. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. Insect physiology and ecology. IntechOpen Book Series. 2017; 179-212.
7. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014; 98(13):5807-22.
8. Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Luan YX, Ling E. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. Front. physiol. 2014; 11; 5:252.
9. Buonocore F, Fausto AM, Pelle GD, Roncevic T, Gerdol M, Picchiatti S. Attacins: A promising class of insect antimicrobial peptides. Antibiotics. 2021;10(2):212.
10. Naafs MA. The antimicrobial peptides: ready for clinical trials. Biomed. J. Sci. Tech. Res. 2018; 7:6038-42.
11. Jo YH, Kim YJ, Park KB, Seong JH, Kim SG, Park S, Noh MY, Lee YS, Han YS. TmCactin plays an important role in Gram-negative and-positive bacterial infection by regulating expression of 7 AMP genes in *Tenebrio molitor*. Sci. Rep. 2017; 18;7(1):1-2.
12. Yi L, Lakemond CM, Sagis LM, Eisner-Schadler V, van Huis A, van Boekel MA. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. Food chem. 2013; 141 (4):3341-8.
13. Jo YH, Park S, Park KB, Noh MY, Cho JH, Ko HJ, Kim CE, Patnaik BB, Kim J, Won R, Bang IS. In silico identification, characterization and expression analysis of attacin gene family in response to bacterial and fungal pathogens in *Tenebrio molitor*. Entomol. Res. 2018; 48(1):45-54.

14. Ratcliffe NA, Mello CB, Garcia ES, Butt TM, Azambuja P. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2011; 41(10): 747-69.
15. Moretta A, Salvia R, Scieuzo C, Di Somma A, Vogel H, Pucci P, Sgambato A, Wolff M, Falabella P. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Sci. Rep.* 2020;10(1):1-4.
16. Elhag O, Zhou D, Song Q, Soomro AA, Cai M, Zheng L, Yu Z, Zhang J. Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.). *PloS one.* 2017 Jan 5;12(1):e0169582.
17. Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins.* 2018;10 (11):461.
18. Emr SD, Silhavy TJ. Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983; 80(15):4599-603.
19. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskis A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016; 371 (1695):20150290.
20. Grau T, Vilcinskis A, Joop G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Z. Naturforsch. C.* 2017;72(9-10):337-49.
21. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* 2011; 8(10):785-6.
22. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25(3):147-50.
23. Dey J, Mahapatra SR, Patnaik S, Lata S, Kushwaha GS, Panda RK, Misra N, Suar M. Molecular characterization and designing of a novel multiepitope vaccine construct against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pept Res Ther.* 2022; 28(2):1-9.
24. Sudha R, Murthy GN, Awasthi AK, Ponnuel KM. Attacin gene sequence variations in different ecoraces of tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Bioinformation.* 2015;11(10):481.
25. Van Moll L, De Smet J, Paas A, Tegtmeier D, Vilcinskis A, Cos P, Van Campenhout L. In vitro evaluation of antimicrobial peptides from the black soldier fly (*Hermetia Illucens*) against a Selection of Human Pathogens. *Microbiol. Spectr.* 2022;10(1):e01664-21.
26. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(23):5862.
27. Rahbar MR, Rasooli I, Gargari SL, Amani J, Fattahian Y. In silico analysis of antibody triggering biofilm associated protein in *Acinetobacter baumannii*. *J. Theor. Biol.* 2010; 266 (2):275-90.

28. Di Somma A, Moretta A, Cané C, Scieuzo C, Salvia R, Falabella P, Duilio A. Structural and functional characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide from *Hermetia illucens*. *Mol. Biol.* 2021; 44(1):1-3.
29. Skorupka K, Han SK, Nam HJ, Kim S, Faham S. Protein design by fusion: implications for protein structure prediction and evolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013; 69(12):2451-60.
30. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(suppl_2):W407-10.
31. Benkert P, Tosatto SC, Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 2008; 71(1):261-77.
32. Holm L, Rosenström P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(suppl_2):W545-9.
33. Yao B, Zhang L, Liang S, Zhang C. SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. *PLoS ONE.* 2012; 7(9): e45152.
34. Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res.* 2010; 6(1):1-9.
35. Rashki M, Mortazavi M. Modeling and determining the structures and characteristics of cytochrome P450 enzymes in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *JMW.* 2020; 42(1):47-57 [In Persian].
36. Javid H. Antigenic properties of *Fingoldia magna* protein L and Type IV Pilin (PilA) for in-silico multi epitope peptide vaccine designing. *JMW.* 2020; 42(1):78-98 [In Persian].