

Comparison of antiviral effect of camel lactoferrin peptide (CLF36) and new generation drugs against hepatitis C virus

Marjan Azghandi 

PhD Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: azghandi.marjan@mail.um.ac.ir

Mojtaba Tahmoorespur 

*Corresponding author. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: m_tahmoorespur@yahoo.com

Mohammad Hadi Sekhavati 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: hadisekhavati@gmail.com

Abstract

Objective

Hepatitis C infection is one of the most common chronic infectious diseases in the world and about 3-5 million people are infected with this infection annually. Unfortunately, despite recent advances, there are still widespread problems for the treatment of these people and many needs have not been met. As a result, there is an urgent need for more effective treatment strategies to treat this disease. One of these new therapeutic approaches is the use of recombinant proteins, which have no side effects for the patient and at the same time are cheap and available.

Materials and methods

To conduct this study, the three-dimensional structures of virus proteases (NS2, NS3, NS4A, NS5A and NS5B) and recombinant peptide CLF36, were obtained. The chemical structure of new generation drugs was also downloaded from PubChem. To evaluate the stability of the predicted structures and to ensure the accuracy of the third structure of proteins, molecular dynamics simulations were performed using GROMACS software version 2019 and in a duration of 10 nanoseconds. Then, to evaluate the antiviral properties of the peptide, molecular docking was performed for peptides and drugs under static conditions. To evaluate the stability of the complexes, based on the results obtained from molecular docking, complexes with negative values of free binding energy were selected to perform molecular dynamics simulations. Finally,

the obtained results were evaluated under dynamic conditions in GROMACS software. The engineered peptides were then designed according to the results and the sequence of the best engineered peptides was sent for synthesis. After cloning and expression of the recombinant peptide in the yeast host, the IC50 level of the peptide on the Huh7.5 liver cell line was determined and the virus-infected cells were treated with the desired peptide. After extracting RNA from the cells, the virus loaded in the sample. Were measured.

Results

Among the results obtained from various dockings performed between virus proteases and recombinant peptides and commercial drugs, it was found that the peptide-binding strength (average -99.92) was much higher than other drugs (average -61.54). This indicates the high antiviral property of the recombinant peptide. The results of molecular dynamics showed that the values of rmsd and hydrogen bonds and binding energy for CLF36 peptide bound to virus proteases compared to other drugs indicate a stronger binding of this peptide. In addition, the engineered peptide showed stronger antiviral activity compared to the natural peptide (binding energy was 8 units stronger). Examination of the function of the peptide in vitro also showed that this peptide has a stronger antiviral effect compared to drugs in that it was able to completely prevent the virus from multiplying in cells.

Conclusions

The final results of this study indicated that recombinant peptide, has strong antiviral properties. However, to confirm these results, additional laboratory studies are needed.

Keywords: Camel Lactoferrin, Hepatitis C, Molecular dynamics, Recombinant Peptide

Paper Type: Research Paper.

Citation: Azghandi M, Tahmoorespur M, Sekhavati M.H (2022) Comparison of antiviral effect of camel lactoferrin peptide (CLF36) and new generation drugs against hepatitis C virus. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 21-44.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (2), 21-44.

DOI: 10.22103/jab.2022.18992.1382

Received: February 9, 2022.

Received in revised form: March 16, 2022.

Accepted: March 16, 2022.

Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors


مقایسه اثر ضد ویروسی پپتید لاکتوفرین شتری (CLF36) و داروهای نسل جدید بر علیه

ویروس هپاتیت C

مرجان ازغندی 


دانشجوی دکترا، گروه علوم دامی، دانش کده کشاورزی، دانش گاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه:

azghandi.marjan@mail.um.ac.ir

مجتبی طهمورث پور 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه:

m_tahmoorespur@yahoo.com

محمدهدای سخاوتی 

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: hadisekhavati@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

چکیده

هدف: عفونت هپاتیت C یکی از شایع ترین بیماری های عفونی مزمن در جهان می باشد و سالانه حدود ۳ تا ۵ میلیون نفر به این عفونت مبتلا می گردند. متأسفانه با وجود پیشرفت های اخیر، هنوز هم مشکلات گسترده ای برای درمان این افراد وجود دارد و بسیاری از نیازها برآورده نشده است. در نتیجه نیاز مبرمی به استراتژی های درمانی موثرتری برای درمان این بیماری می باشد. یکی از این رویکردهای درمانی جدید، استفاده از پروتئین های نو ترکیب است، که هیچ گونه اثرات جانبی برای بیمار نداشته و در عین حال نیز ارزان و قابل دسترس می باشد. در نتیجه هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد ویروسی پپتید نو ترکیب CLF36 مشتق شده از لاکتوفرین شتری بر علیه ویروس هپاتیت C در شرایط برون تنی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ساختارهای سه بعدی پروتئازهای ویروس هپاتیت C (NS2, NS3, NS4A, NS5A) و (NS5B) و پپتید نو ترکیب CLF36، تهیه شد. ساختار شیمیایی داروهای ضد ویروسی نیز از پایگاه PubChem دانلود شد. به منظور بررسی پایداری ساختارهای پیش بینی شده، شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار GROMACS نسخه ۲۰۱۹ و در مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. سپس به منظور بررسی خاصیت ضد ویروسی پپتید، داکینگ مولکولی برای پپتید و داروها در شرایط استاتیک و با استفاده از نرم افزارهای Cluspro و HADDOCK انجام شد. به منظور بررسی پایداری

کمپلکس‌ها، کمپلکس‌های با مقادیر منفی‌تر انرژی آزاد اتصال، جهت انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند. در نهایت نتایج به دست آمده، در شرایط دینامیکی در نرم افزار گرومکس مورد بررسی قرار گرفت. سپس پپتیدهای مهندسی شده با توجه به نتایج طراحی شدند و توالی بهترین پپتید مهندسی شده جهت سنتز ارسال شد. پس از انجام کلون و بیان پپتید نوترکیب در میزبان مخمری، میزان IC50 پپتید بر روی رده سلول کبد Huh7/5 مشخص شد و سلول‌های آلوده به ویروس با پپتید مورد نظر تیمار شدند و پس از استخراج RNA از سلول‌ها، لود ویروس در نمونه‌ها با استفاده از روش Real time PCR سنجیده شد.

نتایج: از بین نتایج به دست آمده از داکینگ‌های مختلف انجام شده بین پروتئازهای ویروس و پپتید نوترکیب و داروهای تجاری، مشخص شد که قدرت اتصال پپتید (به طور میانگین ۹۹/۹۲-) در مقایسه با سایر داروها (به طور میانگین ۶۱/۵۴-) بسیار بیشتر می‌باشد و این امر بیانگر خاصیت ضد ویروسی بالای پپتید نوترکیب است. نتایج به دست آمده از دینامیک مولکولی نشان داد که مقادیر RMSD و پیوندهای هیدروژنی و انرژی اتصال، برای پپتید CLF36 متصل به پروتئازهای ویروس در مقایسه با سایر داروها، حاکی از اتصال قوی‌تر این پپتید می‌باشد. علاوه بر این، پپتید مهندسی شده نیز در مقایسه با پپتید طبیعی، فعالیت ضد ویروسی قوی تری را نشان داد (انرژی اتصال ۸ واحد قوی تر بود). بررسی عملکرد پپتید در شرایط آزمایشگاهی نیز نشان داد که این پپتید در مقایسه با داروها اثر ضد ویروسی قوی تری دارد به صورتی که توانسته بود به طور کامل از تکثیر ویروس در سلول‌ها جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری: نتایج نهایی به دست آمده از این مطالعه، بیانگر این بود که پپتید نوترکیب مهندسی شده، خاصیت ضد ویروسی قوی دارد. هرچند که برای تایید این نتایج، نیاز به انجام مطالعات آزمایشگاهی تکمیلی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: لاکتوفرین شتری، هپاتیت C، دینامیک مولکولی، پپتید نوترکیب

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ازغندی مرجان، طهمورث‌پور مجتبی، سخاوتی محمدادی (۱۴۰۱) مقایسه اثر ضد ویروسی پپتید لاکتوفرین شتری (CLF36) و داروهای نسل جدید بر علیه ویروس هپاتیت C. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۲۱-۴۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

شترها به خانواده شتر سانان، زیرراسته Tylopoda، راسته Artiodactyla و رده پستانداران تعلق دارند (Ghasemi Meymandi et al. 2015). جنس شتر به دو گونه شترهای تک کوهانه (Camelus dromedaries) و دوکوهانه

(Camelus bactrianus) تقسیم می شود. شتر تک کوهانه ساکن شمال آفریقا و خاورمیانه بوده، در حالی که شتر دوکوهانه در آسیای مرکزی ساکن است (Mohammadabadi et al. 2018). علاوه بر شتر تک کوهانه، شتر دوکوهانه نیز در مناطق افغانستان، پاکستان و آسیای جنوب غربی وجود دارد (Ghasemi Meymandi et al. 2016a). زیستگاه شترهای دوکوهانه عمدتاً در مناطق صحرائی سرد چین و مغولستان بوده و نقش مهمی در اقتصاد محلی این مناطق دارند (Ghasemi Meymandi et al. 2016b). شتر از جنبه تاریخی و اقتصادی در سراسر جهان گونه مهمی بوده به طوری که ۱۶٪ جمعیت حیوانی شبه جزیره عربستان را تشکیل می دهد (Barazandeh et al. 2019). لازم به ذکر است که جمعیت شترهای تک کوهانه و دوکوهانه در ایران به ترتیب در حدود ۱۵۰۰۰۰ و ۱۰۰ نفر می باشد. شترهای دوکوهانه ایران جزء گونه های در معرض خطر محسوب شده و زیستگاه آن ها در شمال غربی ایران می باشد. علیرغم اهمیت اقتصادی، فرهنگی و بیولوژیکی، مطالعات مولکولی مرتبط با ژنوم شتر محدود بوده و اطلاعات زیادی در دسترس نیست (Barazandeh et al. 2019).

ویروس هپاتیت یکی از پنج عامل عفونی مرگ زودرس در جهان بوده و سالانه چیزی در حدود ۱/۴ میلیون نفر از جمعیت جهان بر اثر هپاتیت های ویروسی تلف می شوند (Liberto & Marascio 2022). تاکنون شش نوع ویروس هپاتیت شناخته شده که عبارتند از: A، B، C، D، E و G (Harrington & Shannon 1976). هپاتیت C یک عفونت منتقله از راه خون است که در درجه اول کبد را تحت تاثیر قرار می دهد. ویروس هپاتیت C، (HCV¹)، ویروسی RNA دار و دارای پوشش بوده که در خانواده Flaviviridae و جنس Hepacivirus ویروس ها قرار دارد (Inamullah et al. 2011). طول ژنوم HCV حدوداً ۹/۶ kb است و تنها شامل یک ORF طولانی می باشد که کد کننده یک پیش ساز پلی پروتئینی بوده که پس از ترجمه، توسط پروتئین های میزبان و ویروس حداقل به ۱۰ پروتئین عملکردی شکسته می شود که شامل ۴ پروتئین ساختاری (پروتئین های هسته ای، پروتئین های پوششی E1، E2 و P7) و ۶ پروتئین غیر ساختاری (NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A و NS5B) می باشد (Watashi & Shimotohno 2007). بسیاری از این پروتئین های غیر ساختاری، اهداف داروهای ضد ویروسی جدید هستند.

با توجه به توالی ژنومی ویروس هپاتیت C، مشخص شده است که این ویروس دارای ژنوتیپ ها و ساب ژنوتیپ های مختلفی است (Smith et al. 1997). این ویروس دارای شش ژنوتیپ اصلی (با نام های ۱-۶) (Yun et al. 1996)، و بیش از ۷۰ ساب ژنوتیپ (با نام های a، b، c، ...) می باشد (Smith et al. 1997; Simmonds et al. 2005). امروزه گزینه های درمان برای بیماری هپاتیت C رو به توسعه است، به طوری که در سال ۱۹۹۰ نرخ درمان کمتر از ۱۰ درصد بوده، در حالی که این عدد تا سال ۲۰۲۱ به حدود ۹۰ درصد افزایش یافته است (Mangia et al. 2021; Solomon et al. 2021).

¹ Hepatitis C Virus

در مدت ۱۵ سال گذشته، اینترفرون و پس از آن peginterferon (ترکیبی از pegylated و اینترفرون α) پایه اصلی درمان هپاتیت C مزمن بودند، سپس ریبویرین (RBV^2) نیز به صورت ترکیبی با داروهای قبل مورد استفاده قرار گرفت و اخیراً نیز مهارکننده‌های پروتئازهای HCV مانند telaprevir (TVR) و boceprevir (BOC) به گزینه‌های درمانی اضافه شده‌اند (Ferenci 2012). در اواخر سال ۲۰۱۳ هنگامی که ۲ داروی خوراکی ضد ویروسی (simeprevir (SMV) و sofosbuvir (SOF)) توسط اداره کل مواد غذایی و دارویی آمریکا (FDA) مورد تایید قرار گرفت، درمان HCV مزمن وارد فاز جدیدی شد (Kwo & Badshah 2015). SMV مهارکننده پروتئازهای ویروس هپاتیت C و SOF مهارکننده پلیمراز این ویروس می‌باشد. اما با این حال نیز خیلی از بیماران، واجد شرایط استفاده از این نوع درمان نمی‌باشند، چرا که این نوع درمان بسیار هزینه بر بوده و دوره درمان نیز بسیار طولانی می‌باشد و گاهی اوقات لازم است که در ترکیب با درمان‌های قبلی استفاده شود (Shiffman et al. 2014). با توجه به موارد گفته شده نیاز مبرمی به استراتژی‌های درمانی موثرتری بوده، به طوری که علاوه بر افزایش عملکرد و کاهش دوره درمان، تحمل آن برای بیماران راحت تر بوده باشد و همچنین هزینه درمان نیز نسبت به درمان‌های کنونی کاهش یابد. یکی از این رویکردهای درمانی جدید، استفاده از پروتئین‌های نوترکیب است، که هیچ گونه اثرات جانبی برای بیمار نداشته باشد و در عین حال نیز ارزان و قابل دسترس باشد. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین لاکتوفرین می‌باشد، که یک پروتئین چند عملکردی با طیف متنوعی از فعالیت‌های زیستی بوده و کاندید مناسبی جهت کاربردهای بالینی و تجاری می‌باشد. مطالعات انجام شده نشان داده است که پروتئین لاکتوفرین (LF^3) فعالیت ضد ویروسی علیه HCV و همچنین سلول‌های سرطانی دارد (Ikeda et al. 1998; Ikeda et al. 2000; Ueno et al. 2006; Abe et al. 2007; Azzam et al. 2007; Redwan et al. 2007).

لاکتوفرین به عنوان یک پروتئین دفاعی اولیه در برابر میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، از جمله ویروس‌ها شناخته شده است (Kirkpatrick et al. 1971; Yamauchi et al. 1993; Levay & Viljoen 1995; Dial & Lichtenberger 2002). اخیراً مشخص شده است که در بین لاکتوفرین موجودات مختلف، لاکتوفرین شتری از خاصیت ضد ویروسی بالاتری برخوردار است (Redwan & Tabll 2007; El-Fakharany et al. 2013). پپتیدهای مشتق شده از لاکتوفرین دارای بار الکتریکی مثبت تری در مقایسه با لاکتوفرین می‌باشند و خاصیت‌های آب‌گریزی، کاتیونی و ساختار مارپیچ این پپتیدها از جمله ویژگی‌های مهم تعیین کننده فعالیت ضد میکروبی آنها می‌باشد و نشان داده شده است که این پپتیدها در مقایسه با پروتئین لاکتوفرین از خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی بالاتری برخوردار است (Tomita 1994; Gifford et al. 2005). از جمله

² Ribavirin

³ Lactoferrin

مهم ترین پپتیدهای مشتق شده از لاکتوفیرین می توان به لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین اشاره کرد (Bolscher et al. 2009; Haney et al. 2012).

لاکتوفرامپین در برگیرنده اسیدهای آمینه ۲۸۴-۲۶۸ دوماین N1 است، و فعالیت های ضد میکروبی این پپتید بر علیه ویروس ها و باکتری های گرم مثبت و گرم منفی زیادی به اثبات رسیده است (van der Kraan et al. 2004). لاکتوفریسین یک پپتید با عملکرد چندگانه است. این پپتید ۲۵ اسیدآمینه ای در اثر شکستن لاکتوفیرین طبیعی تحت تاثیر پیسین از ناحیه ۴۱-۱۷ به وجود می آید. تفاوت اصلی این پپتید با لاکتوفرامپین به دلیل وجود یک باند دی سولفیدی بین دو اسیدآمینه سیستئین موجود در لاکتوفریسین می باشد. گزارش شده است که این پپتید علاوه بر دارا بودن فعالیت های ضد باکتریایی، بر علیه ویروس ها و پروتوزوآها نیز فعالیت داشته، به علاوه این که فعالیت ضد متاستاز تومورهای سرطانی این پپتید نیز به اثبات رسیده است. (Sinha et al. 2013). مطالعات اخیر نشان داده اند که پپتید CLF36 مشتق شده از لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین شتری، خاصیت ضد میکروبی قوی تری نسبت به هر کدام از پپتیدها به صورت جداگانه دارد (Tanhaiean et al. 2018; Pirkhezranian et al. 2020a; Tahmoorespur et al. 2020). از سوی دیگر، اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی ها در بانک های اطلاعاتی برای یافتن شباهت ها و تفاوت های ژنی، پیش گویی ساختار و عملکرد محصولات ژنها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژنها و توالی های پروتئینی کمک می کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014; Mohammadipour et al. 2021). با توجه به مطالب ارائه شده، هدف از مطالعه حاضر شناخت دقیق مکانیسم عمل داخل سلولی پپتید CLF36 مشتق شده از لاکتوفیرین علیه ویروس هپاتیت C و امکان سنجی بهینه سازی عملکرد و اختصاصیت این پروتئین با استفاده از روش های مهندسی پروتئین و اتصال آن به حامل های پروتئینی مانند پپتیدهای نفوذ کننده به سلول با استفاده از لینکرهای اختصاصی در شرایط مبتنی بر کامپیوتر می باشد.

مواد و روش ها

گرفتن توالی ها و ساختارهای فضایی: قدم اول برای انجام مطالعات بیوانفورماتیکی، گرفتن توالی ها و ساختارهای

فضایی پروتئین ها می باشد. بدین منظور توالی اسیدآمینه ای پروتئین ها و پلیمرز ویروس HCV (NS2, NS3, NS4A, NS5A) از پایگاه Uniprot (<https://www.uniprot.org>) به دست آمد.

پیش بینی ساختار سه بعدی: از آنجایی که به منظور بررسی بررسی بر همکنش آنتی ژن ها با ریسپتورهای سطح سلول،

نیاز به ساختار سه بعدی پروتئین می باشد، در مرحله بعد، ساختار فضایی این پروتئین ها نیز از پایگاه PDB (<https://www.rcsb.org>) گرفته شد. به علاوه توالی و ساختار فضایی پپتید CLF36 نیز از نتایج مطالعات قبلی انجام شده، به دست آمد (Pirkhezranian et al. 2020b).

با توجه به عدم وجود ساختار سه بعدی برخی از پروتئازها (NS5b) به کمک روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از سرور Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org>) ساختار فضایی مربوط به این پروتئین شبیه سازی شدند.

ساختار داروهای ضد ویروسی: از آنجایی که داروهای نسل جدید، داروهایی هستند که پروتئازها و پلیمرزهای ویروس

را هدف قرار می دهند، به منظور مقایسه اثر این داروها با پپتید نوترکیب CLF36 بر علیه ویروس HCV، ساختارهای شیمیایی این داروها از پایگاه داده PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) جمع آوری شد.

داکینگ مولکولی: به منظور انجام داکینگ مولکولی از سرورهای ClusPro و HADDOCK 2.4 استفاده شد. به

منظور مقایسه اثر پپتید CLF36 با داروهای نسل جدید، داکینگ مولکولی بین پروتئازهای ویروس و داروها نیز صورت گرفت و نتایج با هم مقایسه شد. لازم به ذکر است که به منظور حصول اطمینان از نتایج داکینگ، داکینگ مولکولی برای هر کمپلکس با سه بار تکرار انجام شد. سپس، به منظور بررسی پایداری کمپلکسها، بر اساس نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی، کمپلکسهای با مقادیر منفی تر انرژی آزاد اتصال، جهت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند.

شبیه سازی دینامیک مولکولی: در بخش شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکسها، از نرم افزار GROMACS نسخه

۲۰۱۹ استفاده شد (Lindahl et al. 2019) و هر یک از کمپلکسها به طور جداگانه به مدت ۱۰۰ نانوثانیه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس شبیه سازی شدند. انتخاب دمای بالاتر از ۳۷ درجه به علت کمک به جدا شدن پروتئینها از یکدیگر است و پروتئینهایی که در این شرایط همچنان متصل به هم باقی بمانند دارای اتصال قوی تری هستند (He & Ma 2016; Yadav & Negi 2020). به منظور کاهش خطا، فرآیند شبیه سازی برای هر کمپلکس با سه بار تکرار انجام شد.

مهندسی پپتید: در نهایت نیز به منظور رسیدن به اختصاصیت و راندمان بالاتر، پس از رسیدن به نتایج قابل قبول در

مرحله قبل، جایگزینی هدفمند اسیدهای آمینه با هدف انجام مهندسی پروتئین، بر مبنای مطالعات قبلی انجام شده، صورت گرفت (Pirkhezranian et al. 2020b) و از پپتیدهای نفوذ کننده به درون سلول نیز جهت بالا بردن راندمان انتقال پپتید به داخل سلول استفاده شد. در نهایت، پپتیدهای مهندسی شده مجدداً در پروسه داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و نتایج به دست آمده از این مرحله با نتایج قبلی مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

طراحی کاز ستراکت پپتید مهندسی شده و انجام کلون و بیان: پس از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، بهترین پپتید

CLF36 مهندسی شده، از بین کلیه پپتیدها انتخاب شده و پس از بهینه کردن کدونها به منظور افزایش میزان بیان در میزبان مخمر، جهت سنتز ار سال گردید. در توالی سنتز شده علاوه بر بهینه سازی، توالی ناحیه های برشی مناسب (آنزیمهای AgeI و EcoRI) به منظور انتقال به ناقل بیانی مخمر (pPIC-9K) در نظر گرفته شد.

سپس، هضم آنزیمی برای ایجاد ناحیه های مکمل بر روی قطعه و وکتور بیانی، به منظور اتصال آنها انجام شد، میزان آنزیم مورد استفاده طبق دستورالعمل آنزیمها (Thermo Scientific) بود و فرآیند هضم آنزیمی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۵ ساعت انجام

شد. پس از خالص سازی محصولات هضم شده با استفاده از کیت خالص سازی محصولات PCR (QIAGEN) QIAquick، همسانه سازی قطعه حاصل در ناقل pPIC-9K با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (Thermo Scientific) در دمای ۱۶ درجه به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت. محصول لایگیشن به دست آمده از مرحله قبل، با استفاده از روش شوک حرارتی به داخل باکتری ای-کلای TOP10 ترانسفورم شد. صحت انتقال قطعه هدف به درون وکتور، با استفاده از روش های PCR و توالی یابی تایید شد. پس از اطمینان از نو ترکیب بودن وکتور مورد نظر، استخراج پلاسمید از نمونه ها با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت GenetBio و طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. سپس انتقال وکتور نو ترکیب به میزبان مناسب (سلول مخمری *Pichia pastoris*) با استفاده از روش الکتروپوریشن صورت گرفت. پس از کشت مخمرهای ترانسفورم شده، انتخاب مخمرهای تولید کننده پپتید مورد نظر از طریق تیمار آنتی بیوتیک (کانامایسین) غربالگری شده و سلول های مقاوم انتخاب و سلول ها پس از تعیین صحت به وسیله PCR و مرفولوژی و الگوی رشدی انتخاب نهائی شدند. پس انتخاب کلونی های مقاوم، مخمرهای نو ترکیب تکثیر داده شده و استخراج پروتئین با ستون کروماتوگرافی His-tag انجام شد. در مرحله بعد نمونه های استخراج شده بر روی ژل SDS-PAGE لود شده (Manns 2011) و صحت استخراج مورد تایید قرار گرفت. سپس نمونه های استخراج شده با استفاده از روش برادفورد (He 2011) تعیین غلظت شدند.

بررسی خاصیت ضد ویروسی پپتید نو ترکیب در شرایط آزمایشگاهی: به منظور بررسی اثر ضد ویروسی پپتید

نو ترکیب تولیدی، ابتدا مقدار IC50 پپتید با استفاده از روش MTT بر روی سلول های کبدی Huh7.5 به دست آمد. در مرحله بعد، به منظور بررسی مکانیسم ضد ویروسی داخل سلولی، سلول های Huh7.5 آلوده به ویروس هپاتیت C با مقدار IC50 به دست آمده برای پپتید به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از آن، استخراج RNA از نمونه ها با استفاده از کیت استخراج RNA ویروسی NEX™ Diagnostics و طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. در مرحله آخر، لود ویروس با استفاده از کیت HCV Gen RG Kit ساخت شرکت نوین ژن برآورد شد. لازم به ذکر است که به عنوان نمونه کنترل مثبت و منفی، از داروی ریباورین (ماه داروی حکیم) و اینترفرون (بهستان دارو) که در ایران موجود می باشد و PBS نیز به ترتیب استفاده شد. سپس نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

پس از اینکه توالی پروتئین ها از پایگاه NCBI به دست آمد، به منظور دستیابی به ساختارهای سه بعدی پروتئین ها، از پایگاه PDB استفاده شد. نتایج پایگاه PDB بدین صورت است که برای یک پروتئین ممکن است ساختارهای مختلفی ثبت شده باشد. از بین خروجی های به دست آمده از پایگاه PDB، ساختارهایی که کامل تر بودند و از کیفیت بالاتری برخوردار بودند، انتخاب شدند (جدول ۱). ساختار سوم پپتید CLF36 نیز از مطالعات قبلی انجام شده به دست آمد (Pirkhezranian et al. 2020b) و ساختار

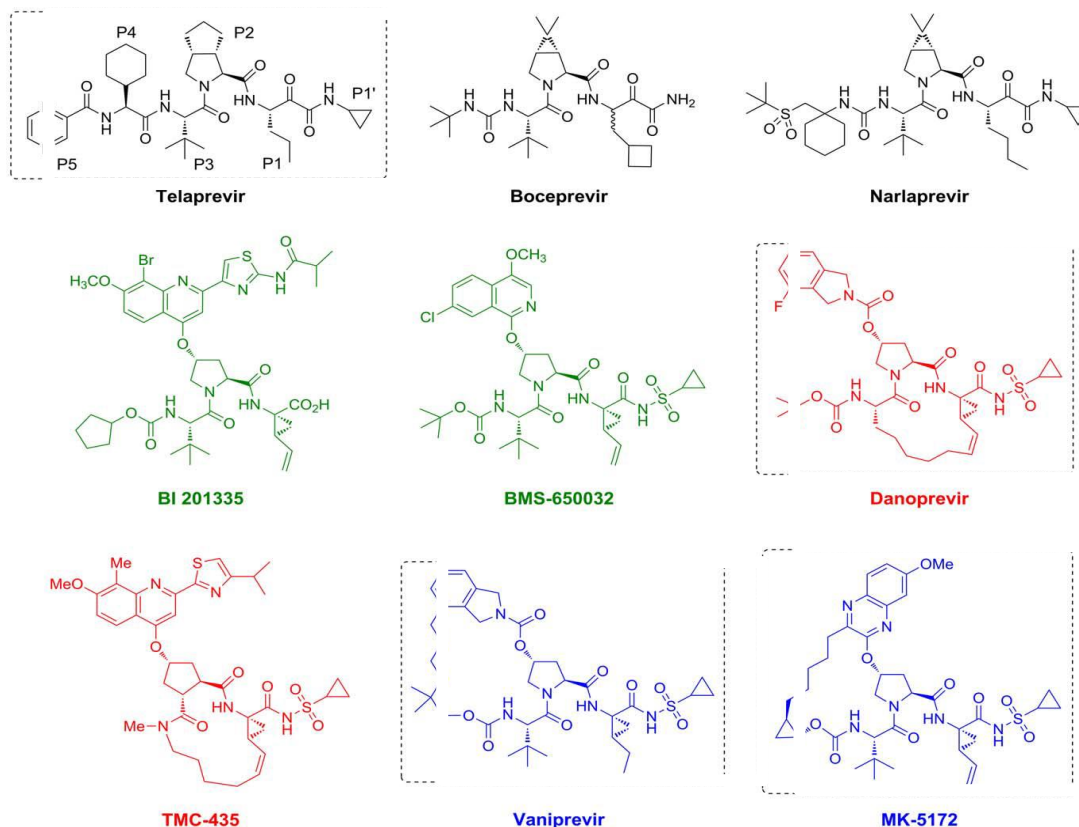
داروهای نسل جدید نیز از پایگاه‌های اطلاعاتی دارویی، جمع‌آوری شد (شکل ۱). به منظور تهیه ساختار سه‌بعدی پروتئین NS5b نیز از روش همولوژی مدلینگ و سرور SWISS MODEL استفاده شد، زیرا در پایگاه داده PDB، ساختار کامل و با کیفیتی از این پروتئین وجود نداشت. خروجی سرورهای همولوژی مدلینگ بدین صورت است که ساختارهای پیشنهادی و پیش‌بینی شده به عنوان ساختار سه بعدی را همراه با امتیازی که خود سرور محاسبه کرده است ارائه می‌کند. برای شبیه‌سازی این ساختارها نیز از توالی و ساختارهای مشابه موجود در پایگاه‌های داده به عنوان نمونه الگو استفاده می‌کند و چندین ساختار پیشنهادی را به عنوان خروجی ارائه می‌دهد. از بین نتایج به‌دست‌آمده از روش همولوژی مدلینگ، ساختاری انتخاب شد که در بین نتایج دارای بهترین پارامترها و بالاترین رتبه‌ها بود. در کل از نتایج به‌دست آمده، سه ساختار پیش‌بینی شده بود که از بین آن‌ها، بهترین ساختار به ترتیب دارای درصد همپوشانی و درصد تشابه، ۸۹/۹۱ و ۹۷/۱۹ درصد انتخاب شد.

دلیل استفاده از روش همولوژی مدلینگ در این مطالعه این بود که این روش جزو دقیق‌ترین روش‌ها در پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین‌ها می‌باشد. این روش بر این اصل استوار است که اگر دو پروتئین دارای شباهت کافی در توالی باشند، احتمالاً دارای ساختار سه بعدی بسیار مشابهی هستند. اگر یکی از توالی‌های پروتئینی دارای ساختار مشخصی باشد، این ساختار می‌تواند با درجه بالایی از اطمینان به پروتئین‌های همولوگ با ساختار نامشخص تعمیم یابد (Schwede et al. 2003). مدل‌سازی همولوژی، یک مدل تمام اتمی را بر پایه انطباق با پروتئین‌های الگو تولید می‌کند. مراحل این روش شامل انتخاب الگو، هم‌ردیفی صحیح توالی‌ها، ایجاد یک اسکلت ساختاری و سپس ایجاد لوپ‌ها، مدل کردن زنجیره‌ی جانبی بر اساس توالی مورد نظر و بالاخره پالاش مدل و ارزیابی آن بر اساس معیار انرژی است. در بین این مراحل هم‌ردیفی توالی‌ها مهم‌ترین مرحله و مدل کردن لوپ‌ها سخت‌ترین و خطا پذیرترین مرحله است. سرور SWISS-model یکی از مهم‌ترین سرورهایی است که از این روش برای پیش‌بینی ساختار پروتئین‌ها استفاده می‌کند (Krieger et al. 2003; Schwede et al. 2003).

جدول ۱. اطلاعات مربوط به ساختارهای پروتئینی گرفته شده از پایگاه PDB

Table 1. Information on protein structures taken from the PDB database

Protein Name	نام پروتئین	PDB ID	شماره دسترسی	Resolution	وضوح
NS2		2hd0		2.28 Å	
NS3		3kn2		2.3 Å	
NS4A		2O8M		2 Å	
NS5A		1ZH1		2.5 Å	

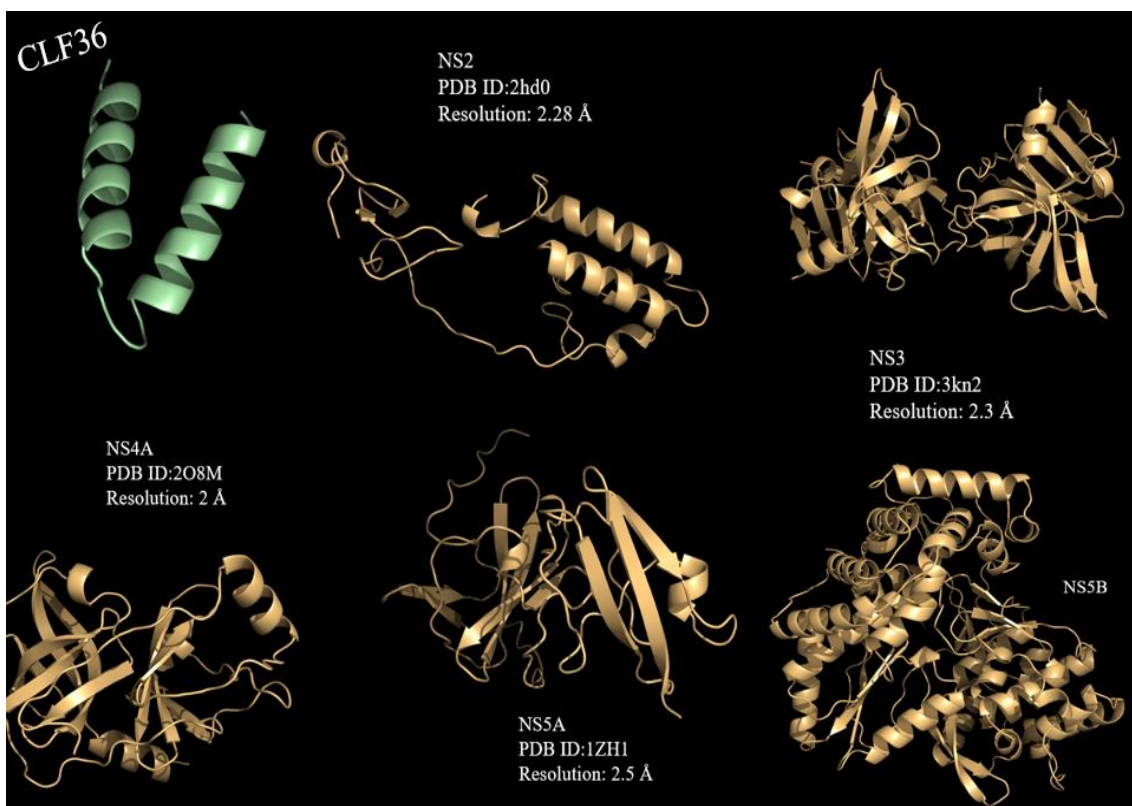


شکل ۱. ساختاری سه بعدی داروهای ضد ویروسی گرفته شده از پایگاه PubChem

Figure 1. Three-dimensional structure of antiviral drugs from PubChem database

سپس برای ارزیابی دقت پیش‌بینی‌ها، و انتخاب صحیح‌ترین ساختار سه‌بعدی، ساختار پیش‌بینی شده در شرایط دینامیکی با استفاده از نرم افزار Gromacs مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت بهترین ساختارها برای انجام داکینگ، انتخاب شدند (شکل ۲). تا کنون چندین مطالعه با رویکردهای محاسباتی، داروهای جدیدی را به عنوان مهارکننده‌های پروتئازهای ویروس HCV پیش‌بینی کرده و از این نتایج در مطالعه تجربی با هدف طراحی دارو استفاده کرده‌اند (Hu et al. 2020; Miao et al. 2020). علاوه بر این نواحی هدف پروتئازهای ویروس نیز شناخته شده است و در مطالعات اخیر اصولاً این نواحی برای طراحی دارو مورد بررسی قرار می‌گیرند (De Clercq 2007; Saleh & Elshemey 2017). همانطور که در شکل ۲ مشخص است، ساختارهای سوم پروتئین‌ها بیشتر به صورت کویل و مارپیچ آلفا و کمتر دارای ساختار صفحات بتا می‌باشد. پیش از این نیز در مطالعات نشان داده شده است که مناطق کویل بیشتر در نواحی سطح پروتئین قرار دارند، جایی که برای اتصال سطح به لیگاند‌ها لازم است تا ساختار سطحی ایجاد شود (Li et al. 2013). ساختار پپتید CLF36 نیز به صورت مارپیچ آلفا می‌باشد. به طوری که در بسیاری از مطالعات نیز بیان شده است که پپتیدها دارای توالی‌های کوتاه و اکثراً دارای ساختار مارپیچ آلفا هستند (Wang & Wang 2004; Lee et al. 2014).

در این مطالعه، پس از اینکه بخش‌های آمینواسیدی که بیشترین احتمال اتصال به دارو را دارند و نواحی فعال به حساب می‌آیند، بر اساس مطالعات مختلف مشخص شد، ساختارها برای بررسی برهمکنش پروتئینی استفاده شدند.



شکل ۲. ساختار سه بعدی پروتئین‌های مورد بررسی در این مطالعه

Figure 2. Three-dimensional structure of the proteins studied in this study

به منظور بررسی برهمکنش بین پروتئین‌های ویروس HCV و پپتید نوترکیب و داروهای ضد ویروسی در شرایط استاتیک، پس از انجام داکینگ مولکولی با سه بار تکرار، نتایج به دست آمده به صورت جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بر این اساس، نتایج به دست آمده از نظر میانگین میزان انرژی اتصال در جدول ۲ آورده شده است. لازم به ذکر است که داکینگ مولکولی بین پروتئین‌های ویروس HCV و تمامی داروهای ضد ویروسی، به صورت جداگانه انجام شد و در نهایت برای هر یک از پروتئین‌ها، دارویی که قوی‌ترین اتصال را داشت، به عنوان کمپلکس نهایی انتخاب شد (جدول ۲).

بر اساس داده‌های داکینگ مولکولی، که با سه بار تکرار انجام شده بود، مقادیر منفی تر انرژی آزاد اتصال (جدول ۲) جهت انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند. نتایج به دست آمده از جدول ۲ که شامل میانگین وانحراف معیار انرژی اتصال می‌باشد، نشان داد که پپتید مشتق شده از لاکتوفیرین شتری یا به عبارتی پپتید نوترکیب CLF36 در مقایسه با داروهای تجاری نسل جدید، از قدرت بالاتری در اتصال به پروتئین‌های ویروس برخوردار هستند. که این امر به دلیل پایین بودن انرژی اتصال

می‌باشد که پیش از این نیز در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است (Shen et al. 2013; Agarwal & Mehrotra 2016; Tanhaiean et al. 2018; Pirkhezranian et al. 2020a). این پپتید در ناحیه N ترمینال پروتئین لاکتوفیرین واقع شده است. مطالعات نشان داده اند که این ناحیه خاصیت ضد میکروبی بالایی دارد. نشان داده شده است که ناحیه C ترمینال^۴ لاکتوفرامپین به دلیل دارا بودن بار مثبت در فعالیت ضد میکروبی این پپتید بسیار حائز اهمیت است، همچنین اسیدهای آمینه ۲۸۴-۲۷۰ ناحیه N ترمینال^۵ نیز برای ساختار هلیکال این پپتید بسیار ضروری است (van der Kraan et al. 2005).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار انرژی اتصال به دست آمده از نتایج داکینگ مولکولی با ۳ بار تکرار

Table 2. Average and Standard deviation of binding energy related to molecular docking results with 3 replications

نام کمپلکس Complex Name	انرژی اتصال Kcal/mol (میانگین) Binding energy (Average)	انحراف معیار Standard deviation
NS2-CLF36	-86.7	1.25
NS2-Telaprevir	-26.4	2.02
NS3-CLF36	-99.5	1.73
NS3- Vaniprevir	-58.1	1.95
NS4A-CLF36	-109.2	2.00
NS4A- Telaprevir	-97.2	1.56
NS5A-CLF36	-97.5	1.29
NS5A- Danoprevir	-27.0	2.03
NS5B-CLF36	-106.7	1.46
NS5B- Telaprevir	-99.0	1.95

در بخش شبیه سازی دینامیک مولکولی، کمپلکس‌ها به مدت ۱۰۰ نانوثانیه در دمای ۵۰ درجه شبیه سازی شدند. انتخاب دمای بالاتر از دمای طبیعی بدن یا به عبارتی همان دمای ۳۷ درجه، به علت کمک به جدا شدن اتصالات پروتئینی بود، به طوری که کمپلکس‌هایی که در این شرایط همچنان متصل به گیرنده باقی بمانند دارای اتصال قوی تری در مقایسه با سایر کمپلکس‌ها هستند (He & Ma 2016; Yadav & Negi 2020). پس از انجام شبیه سازی دینامیکی برای تمامی کمپلکس‌ها، از پارامتر RMSD^۶ جهت تخمین میزان پایداری اتصال پروتئین‌ها در کمپلکس استفاده شد. جذر میانگین مربع انحرافات یا همان

⁴ C-terminal residues

⁵ N-terminal residues

^۶Root-mean-square deviation

RMSD نسبت به ساختار اولیه در طول شبیه سازی یکی از شاخص های مهم در دینامیک مولکولی مدل ها می باشد. در واقع RMSD، میزان انحراف موقعیت ذرات نسبت به موقعیت اولیه را در هر نقطه از زمان نشان می دهد. در حالت تعادل مقدار تغییرهای RMSD بایستی کم تر از ۲ آنگستروم باشد. هر قدر RMSD برای یک یا گروهی از اتم ها در طول شبیه سازی بیش تر باشد، میزان تغییرهای ساختاری آن ها در طی شبیه سازی بیش تر خواهد بود. به عبارت دیگر میزان شیب نمودار RMSD نشان دهنده پایداری مدل در طول شبیه سازی دینامیکی است. هرچه شیب به صفر نزدیک تر باشد مدل شبیه سازی شده پایدارتر است و هرچه شیب به تدریج افزایش یابد یا نوسان زیادی داشته باشد مدل ناپایدارتر خواهد بود (Carugo & Pongor 2001). نمودارهای RMSD یکی برای لیگاند (پپتید و دارو) و یکی برای کل رسبتور (پروتئین و ویروسی) مورد بررسی قرار گرفت. در مواردی که RMSD برای هم لیگاند و هم گیرنده در یک حدود باشند، نشانگر پایداری کمپلکس خواهد بود (Van Der Spoel et al. 2005). اگر RMSD برای لیگاند خیلی زیاد شود نشان می دهد لیگاند در حال کنده شدن از گیرنده است. همچنین تجزیه و تحلیل نتایج، از محاسبه ی تعداد پیوندهای هیدروژنی بین لیگاند و گیرنده به عنوان یک شاخص از پایداری کمپلکس استفاده شد. کم شدن تعداد پیوندهای هیدروژنی نشانگر ناپایداری کمپلکس مربوطه است (Chikalov et al. 2011). با توجه به مقادیر به دست آمده از مقدار RMSD و پیوندهای هیدروژنی مشخص شد که در بین تمامی کمپلکس ها، کمپلکس هایی که با پپتید CLF36 اتصال برقرار کرده بودند، در مقایسه با داروها از اتصال پایدارتر و قوی تری برخوردارند (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار RMSD و پیوند هیدروژنی به دست آمده از نتایج دینامیک مولکولی برای پپتید CLF36 و

داروهای ویروسی با پروتئین های ویروس HCV

Figure 3. RMSD diagram and hydrogen bond obtained from molecular dynamics results of CLF36 peptide and anti viral drugs with HCV virus proteins

نتایج به دست آمده از این بخش با نتایج سایر مطالعات که اثر بخشی پروتئین لاکتوفرین شتری را علیه ویروس‌های مختلف از جمله ویروس هپاتیت مورد بررسی قرار داده اند، کاملاً مشابه است. فعالیت ضد ویروسی لاکتوفرین شتری بر علیه طیف گسترده‌ای از ویروس‌ها به اثبات رسیده است به عنوان مثال می‌توان به ستامگالو ویروس^۷، پولیوما ویروس^۸، ویروس هرپس سیمپلکس (HSV^۹)، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV^{۱۰}) و ویروس هپاتیت B و C اشاره کرد (Redwan et al. 2014). در مقایسه با لاکتوفرین‌های مختلف، نشان داده شده است که لاکتوفرین شتری از خاصیت ضد ویروسی قوی‌تری برخوردار است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که لاکتوفرین شتری (CLF) دارای سه ویژگی منحصر به فرد است که آن را نسبت به سایر لاکتوفرین‌ها، متمایز کرده است. این ویژگی‌ها عبارتند از: برخی از اسیدآمینوهای حیاتی مانند پرولین ۴۱۸، گلایسین ۶۲۹ لایزین ۶۳۷، آرژنین ۶۵۲ و لوسین ۴۲۳ که مربوط به حرکت دومین‌های پروتئین هستند در CLF در مقایسه با سایر گونه‌ها متفاوت است که نشان دهنده تفاوت‌های ساختاری خاص در این گونه می‌باشد. CLF ۵۰ در صد از محتوای آهنش را در PH=6.5 و ۵۰ در صد باقیمانده را در شرایط اسیدی (PH=4-2) از دست می‌دهد. بخش N در PH اسیدی کمتر از ۴ و بخش C در PH=6.5 آهنش را از دست داده که این امر بیانگر مکانیسم متفاوت آزاد سازی آهن در دویخش (C و N) لاکتوفرین در شتر می‌باشد. و مورد آخر اینکه سایت‌های پیش‌بینی گلیکولیزاسیون در CLF در مقایسه با سایر گونه‌ها کاملاً متفاوت است. این داده‌ها نشان می‌دهد که CLF بر خلاف سایر لاکتوفرین‌ها و تراز سفرین‌ها، به عنوان یک نصف لاکتوفرین "پروتئین متصل شونده به آهن" و یک نصف ترانسفرین "پروتئین انتقال دهنده آهن" عمل می‌کند (Khan et al. 2001).

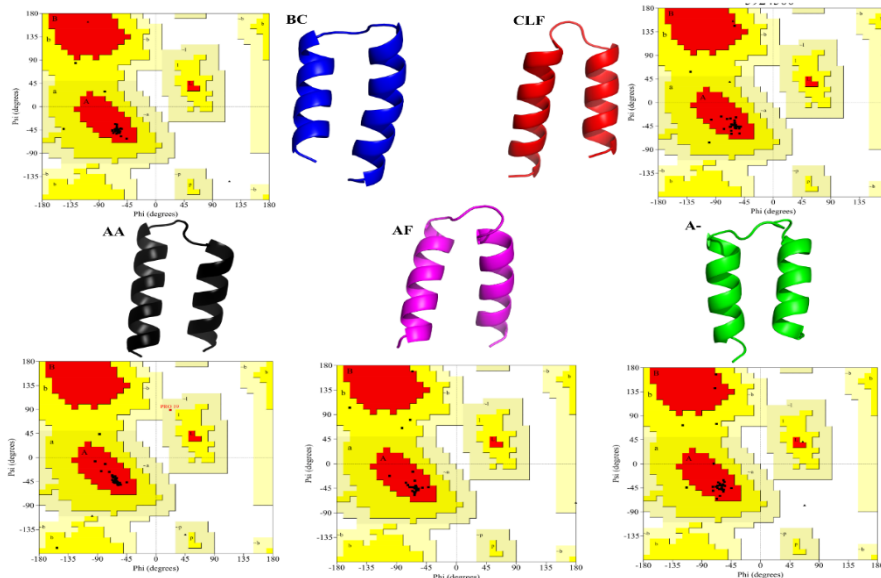
در نهایت، پپتید CLF36 جهت مهندسی پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. پپتیدهای مهندسی شده تحت عناوین AA, AF, BC و A- با توجه به مطالعات قبلی انتخاب شدند. اسیدآمینوهای کلیدی در پپتیدهای مهندسی شده با توجه به نتایج سایر مطالعات تغییر داده شد (Pirkhezranian et al. 2020b) و مجدد اثر ضد ویروسی آن در شرایط دینامیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از مهندسی پروتئین، ابتدا ساختار سوم پپتیدها به دست آمد (شکل ۴) و سپس مراحل داکینگ و دینامیک مولکولی برای پپتیدهای مهندسی شده با پروتئین‌های ویروس HCV، به صورت جداگانه صورت گرفت. به منظور بررسی تاثیر اتصال پپتیدهای مهندسی شده به پروتئین‌های ویروس، مجدداً از شبیه سازی دینامیک مولکولی طبق شرایط قبل استفاده شد. یک بار پپتیدهای مهندسی شده و یک بار پپتید طبیعی شبیه سازی شد و نتایج هر دو مورد به طور کامل با هم مقایسه گردید. نتایج به دست آمده از دینامیک مولکولی پپتیدهای مهندسی شده AA, AF, BC و A-، نشان داد که مقادیر انرژی اتصال برای پپتیدهای مختلف با هم متفاوت است و قوی‌ترین اتصال مربوط به پپتید مهندسی شده A- می‌باشد (شکل ۵).

⁷ cytomegalovirus

⁸ polyomavirus

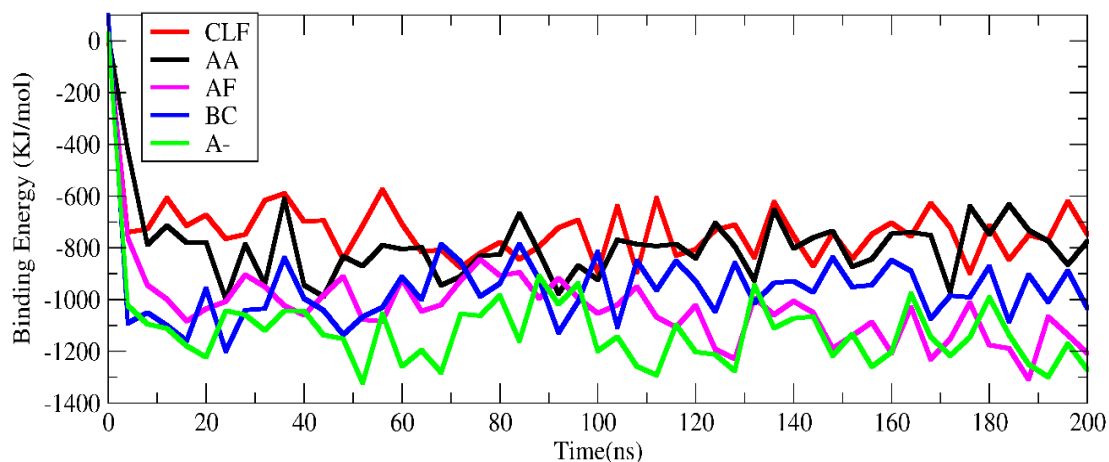
⁹ Herpes simplex virus

¹⁰ Human Immunodeficiency virus



شکل ۴. ساختار پیش بینی شده پپتیدهای مهندسی شده CLF36

Figure 4. Predicted structure of engineered CLF36 peptides

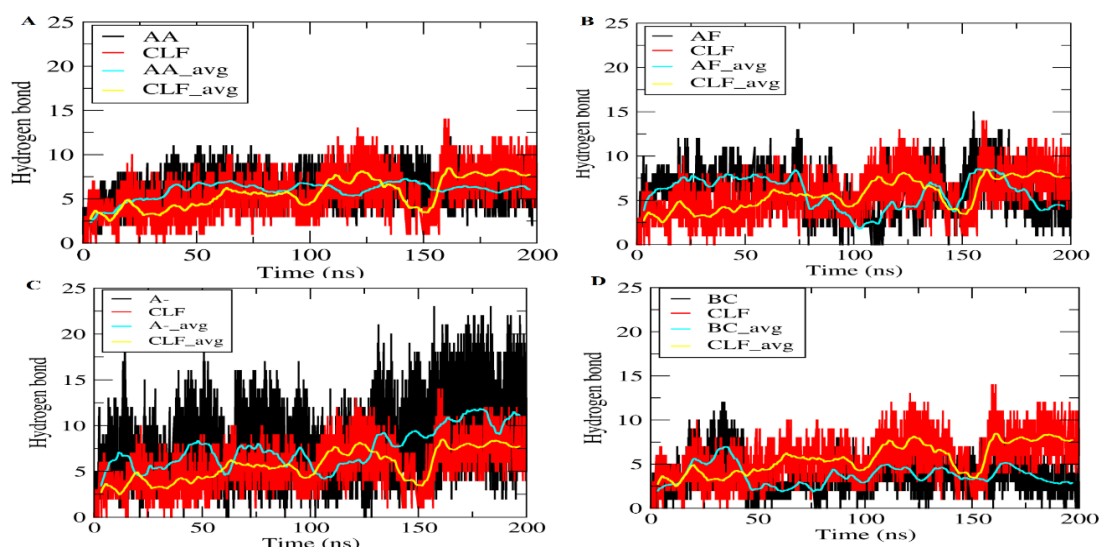


شکل ۵. نتایج دینامیک مولکولی مربوط به اتصال پپتیدهای مهندسی شده با پروتئازهای ویروسی

Figure 5. Results of molecular dynamics simulation related to the binding energy of engineered peptides to viral proteases

نتایج به دست آمده از پیوندهای هیدروژنی درگیر در اتصالات نیز نشان داد که پپتید مهندسی شده A- از قدرت اتصال بالاتری در مقایسه با سایر پپتیدها برخوردار است (شکل ۶). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات بیوانفورماتیک پپتیدهای

مهندسی شده، پپتید نو ترکیب A- که بالاترین عملکرد را نشان داده بود، انتخاب و پس از بهینه سازی کدون‌ها برای سنتز ارسال شد.



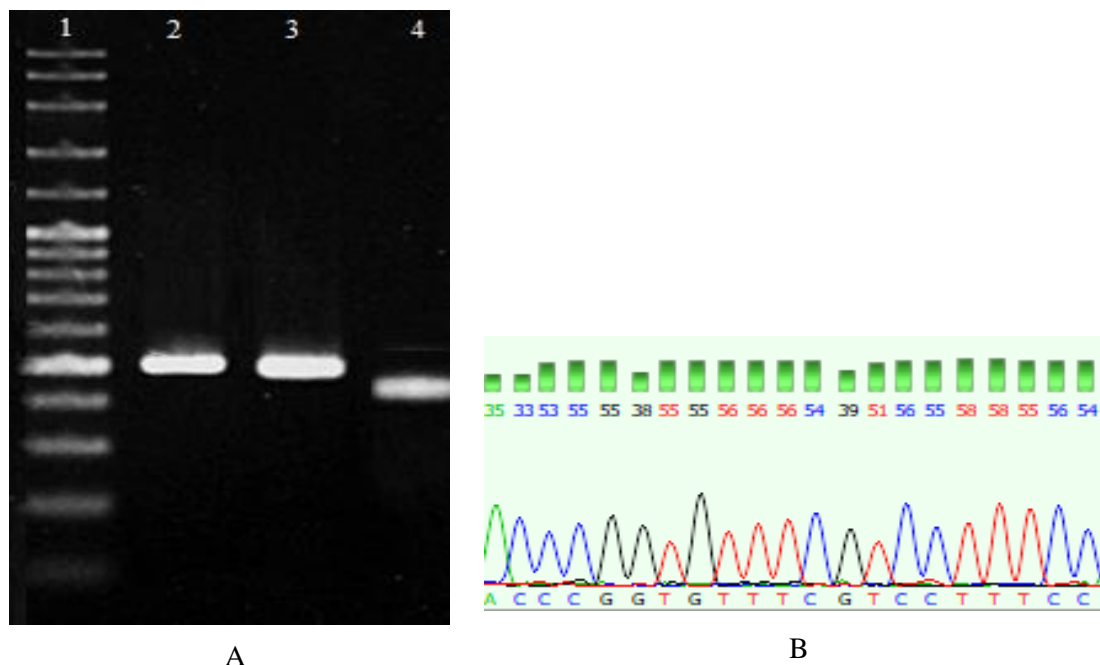
شکل ۶. نمودار پیوند هیدروژنی به دست آمده از نتایج دینامیک مولکولی پپتید CLF36 و پپتیدهای مهندسی شده

Figure 6. Hydrogen bond diagram obtained from molecular dynamics results of CLF36 and engineered peptides

نتایج نشان داد که سنتز قطعه به درستی صورت گرفته بود و بهینه سازی کدون‌ها نیز به درستی انجام شده بود. یکی از عوامل مهم و مؤثر بر میزان بیان پروتئین نو ترکیب اختلاف در کدون اسیدهای آمینه در بین گونه‌ها می‌باشد. استفاده از روش بهینه سازی کدون که شامل حذف المنت‌های نامناسب و تنظیم درصد GC با توجه به سیستم بیانی مورد نظر است، می‌تواند بر این مشکل غلبه کند و راندمان بیان ژن را افزایش دهد. از اینرو برای بهینه سازی عوامل نام برده شده از نرم افزار شرکت GeneScript استفاده گردید تا از ایجاد ساختار لوپ‌های حلقوی که اثر منفی بر روی اتصال ریبوزوم و پایداری mRNA دارند پرهیز گردد (Chung & Lee 2012). نتایج این آنالیز و تغییر کدهای اسید آمینه‌ای نشان داد که کدهای تغییر یافته می‌توانند روند بیان پروتئین نو ترکیب را ارتقاء بخشیده و سبب افزایش راندمان بیان در سیستم بیانی مخمر شوند. همچنین این نتایج اثبات نمودند که ویرایش و طراحی اولیه به خوبی و با بیشترین دقت صورت گرفته بود. زیرا کمترین تغییر در جایگزینی و حذف المان‌های نامطلوب را می‌توان مشاهده نمود.

پس از حصول اطمینان از صحت توالی اِپتیمایز شده و سنتز شده، هضم آنزیمی و فرآیند اتصال (ligation) بر روی نمونه‌ها به درستی صورت گرفت و محصولات لایگشن با استفاده از روش شوک حرارتی، به باکتری TOP10 ترانسفورم شدند و بر روی

محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انتخابی آمپیسیلین کشت داده شدند. پس از آن، نتایج کلنی PCR و توالی یابی نشان داد که باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت انتخابی، نوترکیب بوده و حامل توالی کد کننده پپتید نوترکیب می‌باشند (شکل ۷).

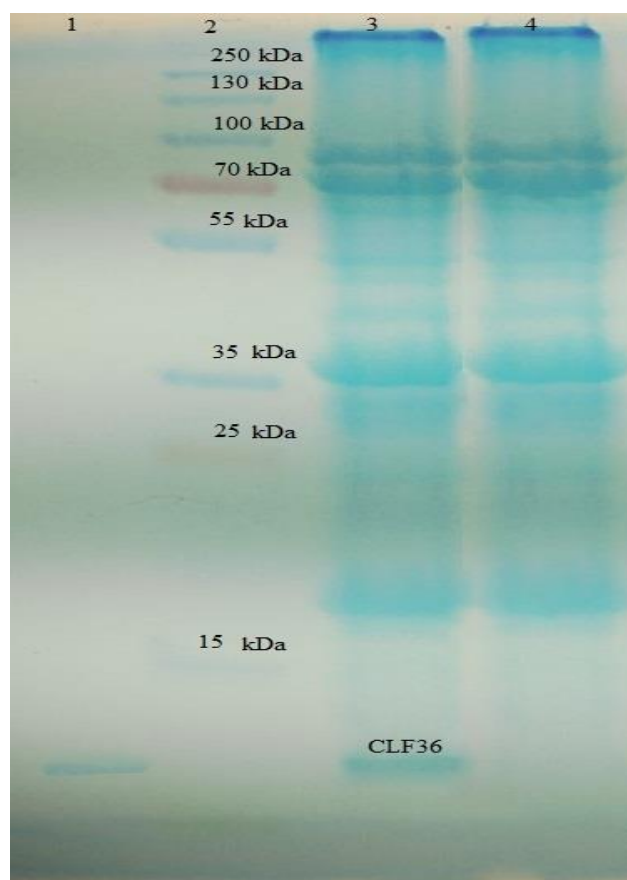


شکل ۷. A) نتایج کلنی PCR. ردیف ۱ سایز مارکر، ۲ و ۳ نمونه‌های نوترکیب و ۴ پلاسمید بدون قطعه می‌باشد. B) نتیجه توالی یابی

Figure 8. A) Colony PCR results. Lane 1 size marker, 2 and 3 are recombinant samples and 4 is self-ligated plasmid. B) Sequencing results

سپس پلاسمیدهای نوترکیب به درستی با روش الکتروپوریشن به داخل مخمر ترانسفورم شدند و نتایج کشت مخمرها نشان داد که مخمرهای رشد داده شده بر روی محیط کشت انتخابی، به درستی رشد کرده‌اند که این امر بیانگر صحت فرایند ترانسفورم می‌باشد. نتایج ژل SDS نیز نشان داد که مخمرهای نوترکیب پپتید مورد نظر را بیان کرده‌اند (سایز پپتید مورد نظر ۵ kDa می‌باشد) و استخراج پروتئین از نمونه‌ها به درستی صورت گرفته است (شکل ۸). پس از خالص سازی پروتئین به وسیله ستون کروماتوگرافی His-taq (شکل ۸)، نتایج برادفورد نشان داد که غلظت پروتئین تخلیص شده، ۶۷۸ نانوگرم بر میلی لیتر می‌باشد. سپس غلظت‌های مختلف از پپتید (۰ تا ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر) بر روی سلول‌ها تیمار شد و در نهایت میزان IC50 به دست آمده برای پپتید، ۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در مرحله بعد، مقدار به دست آمده از پپتید، به علاوه دو مقدار بالاتر و پایین تر به عنوان کنترل (۴۴ و ۱۷۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر روی سلول‌های آلوده به ویروس تیمار شد و نتایج به دست آمده از بررسی لود ویروس در نمونه‌ها

نشان داد که پپتید نو ترکیب در مقایسه با نمونه کنترل (داروهای تجاری موجود در ایران) از عملکرد بهتری برخوردار بوده است (شکل ۹).



شکل ۸. نتایج ژل SDS برای بررسی پروتئین نو ترکیب تولید شده، ردیف ۱ تا ۴ به ترتیب مربوط به پپتید تخلیص شده، سایز مارکر، سوپرناتانت مخمر نو ترکیب و سوپرناتانت مخمر کنترل می باشد.

Figure 8. SDS-PAGE results, lane 1 to 4 correspond to the purified peptide, size marker, recombinant yeast supernatant and control yeast supernatant, respectively.

نتایج به دست آمده از این بخش با نتایج سایر محققین نیز کاملاً مطابقت دارد به گونه‌ای که رضوان و همکاران نشان دادند که لاکتوفرین شیر شتر در شرایط آزمایشگاهی، مانع ورود ویروس هپاتیت C به لوکوسیت‌های انسانی، از طریق تعامل مستقیم با مولکول‌های ویروس به جای تعامل با سلول می‌شوند. نتایج آن‌ها مشابه مطالعات انجام شده با استفاده از لاکتوفرین انسان و گاو در مهار ورود ویروس هپاتیت C (ژنوتیپ ۱) به سلول بود (Redwan & Tabll 2007). علاوه بر این، برخی از مطالعات بالینی نشان داده‌اند که درمان، تنها با پروتئین لاکتوفرین گاوی سطح RNA ویروس هپاتیت C و/یا آلانین آمینوترانسفراز (ALT) را در بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن (CHC) بهبود می‌بخشد (Ishii et al. 2003; Konishi et al. 2006).

CLF36 inhibit HCV replication in infected Huh7.5 cells					
	Copy/ml		Copy/ml		Copy/ml
44 µg/ml CLF36	25813	Ribavirin 200mg/ml	-	Cont - (PcDNA3.1+)	20697
	32016		-		28967
	31752		-		21814
88 µg/ml CLF36	-	Interferon 180µg/0.5ml	-	Cont -	-
	-		-		-
	-		-		-
170 µg/ml CLF36	-	Cont + (HCV)	23400		
	-		24300		
	-		27166		

شکل ۹. نتایج به دست آمده از واکنش Real time PCR. مقدار لود ویروس (تعداد کپی در هر میلی لیتر از محیط کشت) برای غلظت‌های مختلف پپتید، داروها و نمونه‌های کنترل، نمایش داده شده است.

Figure 9. Real time PCR results. Virus load (number of copies per milliliter of culture medium) for different concentrations of peptides, drugs and control samples.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که پپتید نوترکیب مشتق شده از پروتئین لاکتوفرین شتری، خاصیت ضد ویروسی قوی علیه ویروس HCV دارد و در مقایسه با داروهای موجود در شرایط کامپیوتری و آزمایشگاهی، از عملکرد بالاتری برخوردار است و کاندید مناسبی برای دارو می‌باشد. در بین نمونه‌های مهندسی شده نیز پپتید A- که در واقع از جایگزینی یک اسید آمینه آلانین به جای اسید گلوتامیک و همچنین حذف اسید آمینه موقعیت ۳۶ که هر دو موقعیت دارای اثر ممانعت‌کنندگی در پپتید CLF کایمرا بودند به دست آمده بود، هرچند که برای تایید این نتایج، نیاز به انجام مطالعات آزمایشگاهی تکمیلی می‌باشد.

سپاسگزاران: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی به خاطر حمایت مالی / حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزار می‌شود.

منابع

- مهرداد قاسمی میمندی، محمدرضا محمدآبادی، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه، مهدیه منتظری (۱۳۹۵). بررسی انتساب افراد به جمعیت‌هایی از شترهای شمال استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. فصلنامه علمی ژنتیک نوین ۱۱ (۳)، ۳۲۹-۳۳۵.
- قاسمی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده علی (۱۳۹۴). تنوع ژنتیکی شترهای شمال استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. مجله تحقیقات تولیدات دامی ۴ (۱)، ۳۵-۴۵.
- قاسمی میمندی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، منتظری مهدیه (۱۳۹۵). ارزیابی ساختار ژنتیکی شتر با استفاده از روش‌های PCA و خوشه بندی سلسله مراتبی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸ (۳)، ۸۳-۹۶.
- محمدآبادی محمدرضا، قاسمی میمندی مهرداد، منتظری مهدیه (۱۳۹۷). بررسی تنوع ژنتیکی شترهای بومی شمال استان کرمان با استفاده از آماره‌های. نشریه اصلاح و بهنژادی دام ۱ (۲)، ۱۳-۱.

Reference

- Abe Ki, Nozaki A, Tamura K et al. (2007) Tandem Repeats of Lactoferrin-Derived Anti-Hepatitis C Virus Peptide Enhance Antiviral Activity in Cultured Human Hepatocytes. *Microbiol Immunol* 51, 117-125.
- Agarwal S, Mehrotra RJJC (2016) An overview of molecular docking. *JSM chem* 4, 1024-1028.
- Azzam H, Goertz C, Fritts M et al. (2007) Natural products and chronic hepatitis C virus. *Liver Int* 27, 17-25.
- Bolscher JG, Adão R, Nazmi K et al. (2009) Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie* 91, 123-132.
- Carugo O, Pongor S (2001) A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci* 10, 1470-1473.
- Chikalov I, Yao P, Moshkov M et al. (2011) Learning probabilistic models of hydrogen bond stability from molecular dynamics simulation trajectories. *BMC bioinformatics* 12, 1-6.
- Chung BK-S, Lee D-Y (2012) Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst Biol* 6, 1-14.
- De Clercq E (2007) The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov* 6, 1001-1018.
- Dial EJ, Lichtenberger LM (2002) Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochem Cell Biol* 80, 113-117.
- El-Fakharany EM, Sánchez L, Al-Mehdar HA et al. (2013) Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: comparison study. *Virology* 10, 1-10.
- Ferenci P (2012) Treatment of chronic hepatitis C—are interferons really necessary? *Liver Int* 32, 108-112.

- Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK (2015) Genetic variation of camels in the North of Kerman province using microsatellite markers. *Anim Product Res* 4 (1), 35-45 (In Persian).
- Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Esmailzade A, Montazeri M (2016a) Assigning Individuals to the Camel Populations of North of Kerman Province Using Microsatellite Markers. *Modern Genet J* 11 (3), 329-335 (In Persian).
- Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Montazeri M (2016b) Analysing Genetic Structure of *Camelus dromedarius* Using PCA and Hierarchical clustering methods. *Agri Biotec J* 8 (3), 83-96 (In Persian).
- Gifford JL, Hunter HN, Vogel H (2005) Lactoferricin. *Cell mol life sci* 62, 2588-2598.
- Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A, et al. (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. *Modern Genet J* 8 (334), 283-288 (In Persian).
- Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi M, et al. (2014) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. *Modern Genet J* 9(1), 117-120 (In Persian).
- Haney EF, Nazmi K, Bolscher JG et al. (2012) Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin. *Biochim Biophys Acta* 1818, 762-775.
- Harrington JM, Shannon HS (1976) Incidence of tuberculosis, hepatitis, brucellosis, and shigellosis in British medical laboratory workers. *Br Med J* 1, 759-762.
- He F (2011) Bradford protein assay. *Bio-Protocol* e45-e45.
- He Y-M, Ma B-G (2016) Abundance and temperature dependency of protein-protein interaction revealed by interface structure analysis and stability evolution. *Sci Rep* 6, 1-8.
- Hu K, Zhu Z, Mathahs MM et al. (2020) Metalloprotoporphyrin Inhibition of HCV NS3-4A Protease: Structure–Activity Relationships. *Drug Des Dev Ther* 14, 757.
- Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K et al. (2000) Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res* 66, 51-63.
- Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T et al. (1998) Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Bioph Res Co* 245, 549-553.
- Inamullah I, Idrees M, Ahmed H et al. (2011) Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan. *Viol J* 8, 1-5.
- Ishii K, Takamura N, Shinohara M et al. (2003) Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients treated with oral lactoferrin for 12 months. *Hepatol Res* 25, 226-233.
- Khan JA, Kumar P, Paramasivam M et al. (2001) Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual role. *J Mol Biol* 309, 751-761.
- Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR et al. (1971) Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *J Infect Dis* 124, 539-544.

- Konishi M, Iwasa M, Araki J et al. (2006) Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8-isoprostane. *J Gastroen Hepatol* 21, 1821-1825.
- Krieger E, Nabuurs SB, Vriend G (2003) Homology modeling. *Method Biochem Anal* 44, 509-524.
- Kwo PY, Badshah MB (2015) New hepatitis C virus therapies: drug classes and metabolism, drug interactions relevant in the transplant settings, drug options in decompensated cirrhosis, and drug options in end-stage renal disease. *Curr Opin Organ Tran* 20, 235-241.
- Lee J-K, Park S-C, Hahm K-S et al. (2014) A helix-PXXP-helix peptide with antibacterial activity without cytotoxicity against MDRPA-infected mice. *Biomaterials* 35, 1025-1039.
- Levay PF, Viljoen M (1995) Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80, 252-267.
- Li Y, Liu X, Zhu Y et al. (2013) Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Exp ther Med* 6, 335-340.
- Liberto MC, Marascio N (2022) Special Issue “Chronic HCV Infection: Clinical Advances and Eradication Perspectives”. *Multidiscip resp med*. pp. 359.
- Lindahl E, Abraham M, Hess B et al. (2019) GROMACS 2019.4 source code. Zenodo.
- Mangia A, Albanese AP, Bourlière M et al. (2021) Guidelines Have a Key Role in Driving HCV Elimination by Advocating for Simple HCV Care Pathways. *Adv Ther* 38, 1397-1403.
- Manns JM (2011) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Prot Microbiol* 22, A. 3M. 1-A. 3M. 13.
- Miao M, Jing X, De Clercq E et al. (2020) Danoprevir for the treatment of hepatitis C virus infection: Design, development, and place in therapy. *Drug Des Dev Ther* 14, 2759.
- Pirkhezranian Z, Tahmoorespur M, Daura X et al. (2020a) Interaction of camel Lactoferrin derived peptides with DNA: a molecular dynamics study. *BMC Genomics* 21, 1-14.
- Pirkhezranian Z, Tahmoorespur M, Monhemi H et al. (2020b) Computational peptide engineering approach for selection the best engendered camel Lactoferrin-derive peptide with potency to interact with DNA. *Int J Pept Res Ther* 26, 2203-2212.
- Redwan EM, El-Fakharany EM, Uversky VN et al. (2014) Screening the anti infectivity potentials of native N-and C-lobes derived from the camel lactoferrin against hepatitis C virus. *BMC Complem Altern M* 14, 1-16.
- Redwan ERM, Tabll A (2007) Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *J Immunoass Immunoch* 28, 267-277.
- Saleh NA, Elshemey WM (2017) Structure-based drug design of novel peptidomimetic cellulose derivatives as HCV-NS3 protease inhibitors. *Life Sci* 187, 58-63.
- Schwede T, Kopp J, Guex N et al. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31, 3381-3385.
- Shen M, Zhou S, Li Y et al. (2013) Discovery and optimization of triazine derivatives as ROCK1 inhibitors: molecular docking, molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Mol Biosyst* 9, 361-374.
- Shiffman ML, Long AG, James A et al. (2014) My treatment approach to chronic hepatitis C virus. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier pp. 934-942.

- Simmonds P, Bukh J, Combet C et al. (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Sinha M, Kaushik S, Kaur P et al. (2013) Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *Int J Pept* 2013.
- Smith DB, Pathirana S, Davidson F et al. (1997) The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78, 321-328.
- Solomon S, Wagner-Cardoso S, Smeaton L et al. (2021) A simple and safe approach to HCV treatment: findings from the A5360 (MINMON) trial. *Top Med* 38-38.
- Tahmoorespur M, Azghandi M, Javadmanesh A et al. (2020) A novel chimeric anti-HCV peptide derived from camel lactoferrin and molecular level insight on its interaction with E2. *Int J Pept Res Ther* 26, 1593-1605.
- Tanhaiean A, Azghandi M, Razmyar J et al. (2018) Recombinant production of a chimeric antimicrobial peptide in *E. coli* and assessment of its activity against some avian clinically isolated pathogens. *Microb Pathogenesis* 122, 73-78.
- Tomita M (1994) The active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr Japon* 36, 585-591.
- Ueno H, Sato T, Yamamoto S et al. (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Cancer Sci* 97, 1105-1110.
- van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K et al. (2004) Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 25, 177-183.
- van der Kraan MI, Nazmi K, Teeken A et al. (2005) Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. *Biol Chem* 137-142.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. 26, 1701-1718.
- Wang Z, Wang G (2004) APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res* 32, D590-D592.
- Watashi K, Shimotohno K (2007) Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol* 17, 245-252.
- Yadav O, Negi S (2020) Molecular dynamics simulations to see the effect of temperature and pressure change on the dynamics of protein. *Int J Innov Phis* 1, 24-29.
- Yamauchi K, Tomita M, Giehl T et al. (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 61, 719-728.
- Yun Z, Lara C, Johansson B et al. (1996) Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 49, 155-160.