



Original Article

Inhibition of white spot syndrome virus in shrimp using antiviral peptides: A bioinformatics investigation

• Nazifi, Narges* 

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

• Jangaran Nejad, Abdolhossein

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

• Jaydari, Amin

Department of Microbiology and Food Health, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Received: 2024-06-09

Accepted: 2024-07-01

Revised: 2024-06-21

Published: 2024-12-02

*Email: nazifi.nrg@lu.ac.ir

Abstract

The White spot syndrome virus (WSSV) has emerged as one of the most prevalent, widespread and lethal pathogens in shrimp. The virus gains entry into the shrimps through binding membrane protein VP28, thereby initiating an infection. The present study started with a re-examination of the antimicrobial properties of each peptide by the Peptide Scanner server. This was followed by an evaluation of the physicochemical characteristics, solubility, allergenicity, and also the toxicity of the antiviral peptides by the ProtParam, Protein-Sol, AllerTOP, and ToxinPred servers respectively. Subsequently, the third structure of peptides identified in the preceding steps, comprising Ginkbilobin, Circulin-F, Cycloviolin-A, Cycloviolin-D, Circulin-C, Kalata-B8 and Antiviral protein Y3, was predicted by the I-TASSER server. The results of the molecular docking process of each peptide with VP28 protein showed that the mentioned peptides formed 4, 1, 2, 0, 1, 4 and 10 hydrogen bonds with VP28 protein, respectively. In addition, each of them contains 25.50, 41.38, 38.71, 36.67, 33.33, 16.13 and 36.08 percent hydrophobic amino acids, respectively. Ultimately, the Antiviral protein Y3 peptide is the most promising option, followed by Ginkbilobin and Kalata-B8 peptides, due to its length, the presence of hydrophobic amino acids, and the number of hydrogen bonds formed with the VP28 protein. Consequently, following the completion of the molecular dynamics studies, it is recommended that the aforementioned peptides be employed in in-vitro and in vivo investigations aimed at impeding the invasion of WSSV into the shrimp host and subsequently preventing infection.

Key words: Antiviral Peptides; VP28; White Spot Virus Syndrome; Bioinformatics



مقاله کامل

مهار ویروس سندرم لکه سفید در میگو با استفاده از پپتیدهای ضد ویروسی: یک بررسی بیوانفورماتیک

• نرگس نظیفی* ^{ID}

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

• عبدالحسین جانگران نژاد

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

• امین جایدری

گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳-۰۳-۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳-۰۴-۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳-۰۴-۰۱ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۱۰-۰۱

*Email: nazifi.nrg@lu.ac.ir



چکیده

ویروس سندرم لکه سفید (WSSV)، به عنوان یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین پاتوژن‌ها در جمعیت میگو در سطح جهان ظاهر شده است. این ویروس با اتصال به سطح سلول‌های میگو از طریق پروتئین VP28 می‌تواند وارد بدن شده و باعث بروز عفونت شود. در این مطالعه به منظور شناسایی پپتیدهای ضد ویروسی مهارکننده پروتئین VP28، ۳۹ پپتید ضد ویروس از سرور CAMPR3 استخراج شد. مطالعه حاضر با بررسی مجدد آنتی‌میکروپ (AMP) بودن هر یک از پپتیدها توسط سرور Peptide Scanner شروع و با ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حلالیت، آلرژیک بودن و همچنین سمیت پپتیدهای ضد ویروسی به ترتیب توسط سرورهای ProtParam، ProteinSol، Ginkbilobi، Circulin-F، AllerTOP، ToxinPred پیش رفت. در ادامه ساختار سوم پپتیدهای غربال شده از مراحل قبل که شامل Ginkbilobi، Circulin-F، Antiviral protein Y3 و Cycloviolin-A، Cycloviolin-D، Circulin-C، Kalata-B8 هستند، توسط سرور I-TASSER پیش‌بینی شد. نتایج فرایند داکینگ مولکولی نشان داد که پپتیدهای مذکور به ترتیب ۴، ۱، ۲، ۰، ۱، ۴ و ۱۰ پیوند هیدروژنی با پروتئین VP28 تشکیل داده‌اند. این در حالی است که هریک از آن‌ها به ترتیب دارای ۲۵/۵۰، ۴۱/۳۸، ۳۸/۷۱، ۳۶/۶۷، ۳۳/۳۳، ۱۶/۱۳ و ۳۶/۰۸ درصد اسید آمینه آبگریز هستند. در نهایت، با توجه به نتایج پپتید Antiviral protein Y3 را می‌توان به عنوان اولین انتخاب و پس از آن نیز پپتیدهای Ginkbilobi و Kalata-B8 را به عنوان مناسب‌ترین و امیدوارکننده‌ترین گزینه‌ها در نظر گرفت. بنابراین پپتیدهای مذکور را بعد از انجام مطالعات دینامیک مولکولی می‌توان برای بکارگیری در مطالعات *in vitro* و *in vivo* روی مهار ورود WSSV به میزبان میگو و سپس جلوگیری از بروز عفونت توسط این ویروس پیشنهاد داد.

کلمات کلیدی: پپتیدهای ضد ویروسی؛ VP28؛ ویروس سندروم لکه سفید؛ بیوانفورماتیک

گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی مشارکت دارند. امروزه پژوهش‌های بسیاری با هدف بکارگیری پپتیدها در حال انجام است. یکی از این مباحث استفاده از این ترکیبات به‌عنوان به‌عنوان دارو در صنعت داروسازی، مهار سرطان و تومور، مشارکت در بیان یا خاموش کردن ژن، انتقال هدفمند پپتیدها به بافت‌ها، محرک رشد و حفظ مواد غذایی بوده است. پپتیدها می‌توانند خواص ارزشمندی همچون خاصیت ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بايوفیلیم از خود نشان دهند. به‌طور کلی، پپتیدها در طبیعت به‌صورت محدود هستند، بنابراین محققان با سنتز آن‌ها به‌عنوان پپتیدهای زیستی فعال، می‌توانند طیف گسترده‌ای از آن‌ها را تولید نمایند (۸، ۹، ۱۴). بنابراین هدف از مطالعه پیشرو شناسایی مناسب‌ترین پپتیدهای کوچک ضد میکروبی (AMP) برای مهای پروتئین VP28 از ویروس سندروم لکه سفید با هدف استفاده از این پپتیدها در طراحی ترکیبات دارویی برعلیه بیماری سندروم لکه سفید در میگو می‌باشد.

روش انجام کار

جمع‌آوری پپتیدهای ضد ویروسی و بررسی احتمال ضد میکروبی

بودن آن‌ها

در پژوهش حاضر به منظور جمع‌آوری توالی اسید آمینه‌ای پپتیدهای ضد ویروسی، به پایگاه معتبر داده‌های ضد میکروبی CAMPR3 (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/>) مراجعه شد. در این راستا، توالی‌های پپتیدی موجود در این مجموعه ابتدا بر اساس طول (۱۰۰-۱ اسید آمینه) و سپس بر اساس تایید تجربی و همچنین ضد ویروسی بودن هر یک از آن‌ها فیلتر شدند. در ادامه از میان توالی‌های پپتیدی فیلتر شده، توالی‌هایی که دارای شماره شناسایی در سرور UniProt (<https://www.uniprot.org/>) بودند انتخاب گردیدند. همچنین، توالی اسید آمینه‌ای پروتئینی VP28 از ویروس سندروم لکه سفید از پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) با شماره دسترسی YP-009220614,1 به دست آمد. برای بررسی احتمال AMP پپتیدهای ضد ویروسی بالقوه، سرور Antimicrobial Scanner Peptide (<https://www.dveltri.com/ascan/v2/ascan.html>) ورژن ۲ با سطح آستانه 0.5 استفاده شد. بدین منظور، توالی اسید آمینه هر پپتید ضد ویروسی بالقوه‌ای در قالب FASTA در سرور مذکور ثبت شد. با هدف افزایش میزان حساسیت این انتخاب، پپتیدهای ضد ویروسی با امتیاز بالاتر از 0.7 انتخاب شدند. در نهایت، پپتیدهای ضد ویروسی بالقوه باقی‌مانده برای تجزیه و تحلیل بعدی استفاده شد.

ارزیابی خواص فیزیوشیمیایی و حلالیت پپتیدهای ضد ویروسی

در مطالعه حاضر، مهم‌ترین خواص فیزیوشیمیایی پپتیدهای ضد ویروسی بدست آمده از مرحله قبلی مانند نقطه ایزوالکتریک، GRAVY، شاخص ناپایداری و بارالکتریکی خالص توسط سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی شد. برای پیش‌بینی این خواص، توالی اسید آمینه هر پپتید روی سرور مذکور بارگذاری شد. پپتیدهایی که شاخص ناپایداری آن‌ها بیش از ۴۰ بود یا بار خالص الکتریکی منفی یا صفر داشتند از تجزیه و تحلیل‌های بعدی در این مطالعه حذف شدند.

مقدمه

ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) مهم‌ترین پاتوژن اقتصادی میگوی پرورشی در سراسر جهان است، این ویروس که سبب رسوب غیرنرمال و عدم جذب نمک کلسیم در اپی‌درم کوتیکول می‌شود می‌تواند تا ۱۰۰ درصد تلفات در ده روز اول بروز عفونت در مزارع پرورش میگو ایجاد کند. میزبان اصلی این ویروس سخت پوستان ده‌پا هستند که با انتقال به صورت افقی یا عمودی می‌توانند به این ویروس آلوده شوند (۱، ۲). بروز این بیماری در میگو می‌تواند سبب جداسدن سریع پوسته میگو از لایه درمیس و عدم انعقاد همولنف و تغییر رنگ و بزرگ شدن هپاتوپانکراس شود (۳). علاوه بر این میگوهای درگیر با این ویروس به شدت بی‌حال و سست می‌شوند و به دنبال آن توقف یا کاهش شدید مصرف غذا در آن‌ها دیده می‌شود و ظرف چند روز، میگوهای در حال مرگ در کناره‌های استخرها و نزدیک به سطح آب دیده می‌شوند. در میگوهای مبتلا به عفونت حاد ناشی از این ویروس نرخ تلفات بالا همراه با مرگ و میر توده‌ای مشاهده می‌شود (۴). از راه‌های کنترل و پیشگیری از شیوع این ویروس می‌توان به استفاده از ترکیباتی مانند کلرین، فرمالین، پویدین، آبوداین، اتیل‌الکل، ازون، بکارگیری UV، استفاده از پست لاروهای عاری از بیماری و قوی، ممانعت از ورود سخت پوستانی مانند خرچنگ و میگوهای وحشی به استخر پرورشی اشاره داشت (۵) همچنین واکسیناسون توسط واکسن‌های نو ترکیب زیر واحدی (۶) و با بکارگیری ویروس‌های غیرفعال شده به روش اشعه گاما (۷) نیز تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است. ویروس WSSV دارای حداقل پنج پروتئین ویرونی اصلی است که سه تا از آن‌ها در نکلئوکپسید میله‌ای (VP15، VP24، VP26) و دو تای دیگر در غشای ویروس (VP19 و VP28) وجود دارند که هیچ شباهتی با سایر پروتئین‌های ساختاری ویروس‌ها ندارند ولی نقش مهمی در بیماری‌زایی ویروس دارند (۸). پروتئین پوششی اصلی VP28 در شروع اتصال ویروس به سلول‌های میگو حیاتی است. در نتیجه به گسترش این عفونت ویروسی کمک می‌کند. از آنجا که، این پروتئین پوششی را عامل اصلی تکثیر ویروس و عفونت بر می‌شمارند، بنابراین از آن به‌طور گسترده برای توسعه واکسن و تشخیص مبتنی بر آنتی‌بادی برای بیماری ویروس لکه سفید استفاده می‌کنند (۹، ۱۰). پروتئین VP28 شامل یک بشکه β و یک مارپیچ α در بخش N ترمینال است که با زاویه 20° از صفحه β بیرون زده است. این مارپیچ α برجسته که شامل اسید آمینه‌های Thr32 تا Asn47 است توسط یک سیم‌پیچ ۲ اسید آمینه‌ای به هسته بشکه β متصل می‌شود. ابعاد کلی صفحه β تقریباً 35 \AA (ارتفاع) در 15 \AA (قطر) است (۱۱). برای مقابله با پاتوژن‌ها از طریق تقویت سیستم ایمنی ذاتی در میگو، روش‌هایی برای مانند بکارگیری محرک‌های سیستم ایمنی از قبیل بتا ۱ و ۳ گلوکان، پپتیدوگلیکان و لیپوپلی ساکارید، استفاده از پروبیوتیک‌ها برای اصلاح و تقویت سلامت عمومی میگوها و همچنین استفاده از پست لاروهای عاری از ویروس برای ذخیره‌سازی و مدیریت کیفی آب و همچنین جلوگیری از ورود عوامل ناقل ویروس استفاده شده است و متأسفانه می‌توان ادعا داشت که بکارگیری هیچ یک از آن‌ها تاکنون موفق نبوده است (۱۲، ۱۳). پپتیدها توالی آمینواسیدی هستند که توسط پیوند پپتیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. این ترکیبات در طیف

طول پیوندهای هیدروژنی حاصل از این برهم‌کنش‌ها و همچنین اسید آمینه‌های درگیر در این ارتباط، توسط نرم‌افزار LigPlot+ ورژن ۲/۲/۸ و نرم‌افزار PyMol ورژن ۱/۳ بررسی و مشاهده شدند.

نتایج

جمع‌آوری داده‌ها و بررسی احتمال ضد میکروبی

در راستای انجام مطالعه پیشرو، جمع‌آوری پپتیدهای کوتاه ضد ویروسی از پایگاه داده CAMPR3 با موفقیت انجام شد. در این مجموعه پپتیدهای ضد ویروسی که دارای طول (۱۰۰-۱۰) اسید آمینه) و کد دسترسی به سرور UniProt و همچنین تایید شده از طریق آزمایشات تجربی بودند حضور داشتند (جدول ۱). تمامی پپتیدهای جمع‌آوری شده برای بررسی بیشتر از نظر امکان ضد میکروبی بودن مجدد بررسی شدند و به جز پپتیدهای *Cicadin* و *Alpha-basrubrin* که ضد میکروب شناخته نشدند، سایر پپتیدهای استخراج شده از مرحله قبل با امتیاز بالایی به عنوان یک پپتید ضد میکروبی شناخته و تایید شدند (جدول ۱).

ارزیابی خواص فیزیکی‌شیمیایی پپتیدهای ضد میکروبی

در پروژه حاضر، بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی هر یک از پپتیدهای باقی‌مانده از مرحله قبل توسط سرور ProtParam با موفقیت انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده بخشی از پپتیدهای مورد بررسی به دلیل داشتن بار خالص منفی یا صفر و یا شاخص بی‌ثباتی بالاتر از ۴۰ (40) از تجزیه و تحلیل بیشتر حذف شدند. پپتیدهای ضد میکروبی حذف شده شامل *Beta-basrubrin*، *Rhesus theta*، *Peptide Ctri9194*، *subunit A precursor*، *Thaumatococcus-like protein*، *3/1-defensin Neutrophil*، *2-Vhl*، *1.1-Circulin-E*، *Caerin*، *06-NP*، *Actc2*، *Palicourenin*، *1-Mytilin-B*، *Melittin*، *Vhl*، *6-Defensin*، *3 defensin 4-precursor*، *Corticoſtatin 3-Corticoſtatin*، *6-Corticoſtatin precursor* و *57-Antimicrobial peptide* می‌باشند پپتیدهای باقی‌مانده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. از بین پپتیدهای ضد ویروسی باقیمانده، بیشترین طول و در نتیجه بیشترین وزن مولکولی مربوط به پپتید *Antiviral protein Y3* و کمترین آنها مربوط به پپتید *Maximin ۱* بود. از طرفی بیشترین نقطه ایزوالکتریک با شاخص ۱۱/۷۱ مربوط به پپتید *Cycloviolin-B* بود و بالاترین و پایین‌ترین ویژگی GRAVY نیز با شاخص‌های ۰/۶۰۸- و ۱/۱۸۸ به ترتیب مربوط به پپتیدهای *Cycloviolin-A* و *Beta-defensin* می‌باشد (جدول ۲).

ارزیابی میزان آب‌گریزی و حلالیت پپتیدها

بر اساس نتایج ارائه شده توسط سرور Protein-Sol، مشخص شده که تمام پپتیدهای باقی‌مانده از مرحله قبل محلول می‌باشند (جدول ۳). از طرفی ویژگی آب‌گریزی پپتیدهای انتخاب شده از مرحله قبل با موفقیت با استفاده از سرور PEPTIDE 2.0 تعیین شد. همانطور که در جدول ۳ گزارش شده است، پپتیدهای انتخاب شده بر اساس درصد اسیدهای آمینه آب‌گریز دسته‌بندی شدند. نتایج نشان داد که پپتید *3-Dermaseptin* با ۵۳/۳۳ درصد باقیمانده اسید آمینه آب‌گریز دارای بیشترین تعداد اسیدهای آمینه آب‌گریز است، در حالی که پپتید *Kalata-B8* با ۱۶/۱۳

سپس آب‌گریزی/آب دوستی پپتیدهای باقی‌مانده توسط سرور PEPTIDE2.0 (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php) ارزیابی شد تا پپتیدهای ضد ویروسی باقی‌مانده از مرحله قبل، در رابطه با این ویژگی نیز مجدد غربال شوند. در نهایت مجدداً با استفاده از فرمت FASTA توالی اسید آمینه هر پپتید ضد ویروسی، حلالیت آن‌ها نیز با بکارگیری سرور Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) ارزیابی شد.

ارزیابی آلرژیک بودن و همچنین سمیت پپتیدهای ضد ویروسی

در این مرحله هر یک از پپتیدهای ضد ویروسی که در مرحله غربالگری توسط خواص فیزیکی‌شیمیایی تایید شده بودند، جهت تعیین آلرژن بودن یا نبودن و همچنین سمی بودن یا نبودن آن‌ها به ترتیب توسط سرور AllerTOP v. ۲/۰ (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) و سرور ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/protein.php>) بررسی شدند. برای استفاده از هر دو سرور مذکور توالی هر یک از پپتیدهای کوچک ضد میکروبی بکار گرفته شدند

پیش‌بینی ساختار سوم

ساختارهای سوم پپتیدهای ضد ویروس غربال شده (پپتیدهایی که بر اساس پروفایل اسید آمینه اختصاصی خود دارای ویژگی‌هایی همچون آب‌گریزی، حلالیت، غیر سمیت و غیر آلرژیک هستند) به همراه پروتئین VP۲۸ با استفاده از سرور I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) مدل شدند. بهترین مدل پروتئین VP۲۸ توسط این سرور که دارای بالاترین امتیاز اطمینان (C-Score) بود، به ترتیب با استفاده از سرورهای GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) و VADAR (<http://vadar.wishartlab.com/>) اعتبارسنجی شد.

داکینگ مولکولی

تعامل بین پروتئین VP۲۸ به عنوان گیرنده و پپتیدهای ضد ویروسی انتخاب شده به عنوان لیگاند به طور جداگانه با استفاده از سرور ClusPro2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) انجام شد. یک سرور کاملاً خودکار است که برای پیش‌بینی تعامل پروتئین و پروتئین استفاده می‌شود. در مرحله اول، این سرور از Piper که یک برنامه اتصال سخت مبتنی بر FFT است استفاده می‌کند. در این مرحله بر اساس الگوریتم سرور ClusPro، در ابتدا لیگاندها با ۷۰۰۰۰ بار چرخش می‌چرخند و در سه محور X، Y و Z نسبت به گیرنده روی یک شبکه (grid) انتقال می‌یابند. از بین این ۷۰۰۰۰ چرخش ۱۰۰۰ مورد چرخشی که بهترین جایگیری یا انتقال لیگاند روی گیرنده را با کمترین میزان انرژی نشان دادند انتخاب می‌شود و آن‌هایی که دلیل انرژی اتصال بالا ناپایدار هستند حذف می‌شوند. در ادامه خوشه‌بندی داکینگ پروتئین و لیگاند به این صورت است که هر وقت نزدیکترین موقعیت برای مجاور شدن صحیح لیگاند به رسپتور با شعاع ۹ rmsd انگستروم کربن آلفا پیدا شود به عنوان مرکز خوشه انتخاب می‌شود و همسایگان آن نیز اعضای خوشه می‌شوند. سپس همه این‌ها از مجموعه حذف می‌شوند و سیستم به دنبال مرکز خوشه دوم خواهد گشت. در نهایت، تعداد و

جدول ۱- لیست پپتیدهای کوتاه ضد ویروسی استخراج شده از پایگاه CAMPR۳.

شماره	نام پپتید	UniProt ID	منبع	توالی اسید آمینه	احتمال آنتی میکروب بودن
۱	Peptide Ctri9194	۲۳۴۱۵۰۴۴	Chaerilus tricostatus	YIRDFITRRPPFGNI	AMP (0/53)
۲	Beta-basrubin	P83187	Basella alba	KIMAKPSKFYEQLRGR	AMP (0/51)
۳	Rhesus theta defensin-1/3, subunit A precursor	P82270	Macaca mulatta	GFCRCICTRGFCRCICTR	AMP (1)
۴	Thaumatococcus-like protein , Actc2	P83958	Actinidia chinensis	ATFNFINNCPFTVWAAAAPVG	AMP (0/98)
۵	Alpha-basrubrin	P83186	Basella alba	GADFQECMKEHSQKQHQHQG	NON-AMP (0/01)
۶	NP-06	-	streptomyces strain AA۶۵۳۲	CLGVGSCNDFAGCGYAIVCFW	AMP (1)
۷	Caerin-1.1	P62568	Litoria splendida	GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL	AMP (0/99)
۸	Melittin	1BH1, 2MLT	Apis mellifera	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	AMP (0/99)
۹	Maximin 1	P83080	Bombina maxima	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYAN	AMP (0/99)
۱۰	Cycloviolon-B	P84638	Leonia cymosa	GTACGESCIVLPCFTVGTCTSSQCFKN	AMP (1)
۱۱	Neutrophil antibiotic peptide NP-3 precursor	Q62713	Rattus norvegicus	CSCRTSSCRFGERLSGACRLNGRIYRLCC	AMP (1)
۱۲	Circulin-F	P84644	Chassalia parviflora	AIPCGESCIVWIPICISAAIGCSCKNKVCYR	AMP (1)
۱۳	Neutrophil defensin 3, Defensin-6	P59666	Homo sapiens	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC	AMP (1)
۱۴	Neutrophil cationic peptide 1 type B preproprotein	Q64365	Cavia porcellus	RCICTTRTCRFPYRRLGTCTIFQNRVYTFCC	AMP (1)
۱۵	Vhl-2	P85231	Viola hederacea	GLPVCGETCFTGTCTYNGTCTDPWPVCTRN	AMP (1)
۱۶	Dermaseptin-3	P80279	Phyllomedusa sauvagii	ALWKNMLKGIGLAGKAAALGAVKKLVGAES	AMP (0/99)
۱۷	Cycloviolon-C	P84639	Leonia cymosa	GIPCGESCIVFIPCLTTVAGCSCKNKVCYRN	AMP (1)
۱۸	Cycloviolon-D	P84640	Leonia cymosa	GFPCGESCIVFIPICISAAIGCSCKNKVCYRN	AMP (1)
۱۹	Circulin-C	P84641	Chassalia parviflora	CGESCIVFIPCTTSVAGCSCKSKVCYRNGIP	AMP(1)
۲۰	Circulin-D	P84642	Chassalia parviflora	KIPCGESCIVWIPCVTSIFNCKCENKVCYHD	AMP (0/99)
۲۱	Circulin-E	P84643	Chassalia parviflora	KIPCGESCIVWIPCLTSVFNCKCENKVCYHD	AMP (0/99)
۲۲	Neutrophil antibiotic peptide NP-4 precursor	Q62714	Rattus norvegicus	ACYCRIGACVSGERLTGACGLNGRIYRLCCR	AMP (1)
۲۳	Vhl-1	P84522	Viola hederacea	SISCGESCAMISFCFTEVIGCSCKNKVCYLN	AMP (0/99)
۲۴	Kalata-B8	P85175	Oldenlandia affinis	GSVLNCGETCLLGTCTYTTGCTCNKYRVCTKD	AMP (1)
۲۵	Cycloviolon-A	P84637	Leonia cymosa	GVIPCGESCIVFIPICISAAIGCSCKNKVCYRN	AMP (1)
۲۶	Human Defensin-5	Q01523	Homo sapiens	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR	AMP (0/99)
۲۷	Corticostatin-3 precursor	P01376	Oryctolagus cuniculus	VVCACRRALCLPRERRAGFCRIRGRIHPLCCRR	AMP (1)
۲۸	Corticostatin-4 precursor	P01377	Oryctolagus cuniculus	VVCACRRALCLPLERRAGFCRIRGRIHPLCCRR	AMP (1)
۲۹	Mytilin-B	P81613	Mytilus edulis	SCASRCKGHCRARRCGYVSVLYRGRVCYCKLRC	AMP (1)
۳۰	Corticostatin-6	P80223	Oryctolagus cuniculus	GICACRRRFCLNFEQFSGYCRVNGARYVRCCSRR	AMP (1)

ادامه جدول ۱- لیست پپتیدهای کوتاه ضد ویروسی استخراج شده از پایگاه CAMPR۳.

شماره	نام پپتید	UniProt ID	منبع	توالی اسید آمینه	احتمال آنتی میکروب بودن
۳۱	Reptilian Defensin	P0CAP0	Caretta caretta	EKKCPGRCTLKCGKHERPTLPYNSCGKYICVVP VKVK	AMP (1)
۳۲	Palicourein	P84645	Palicourea condensata	GDPTFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRSDDL CKRN	AMP (0.99)
۳۳	Ginkbilobin	P83171	Ginkgo biloba	ANTAFVSSAHNTQKIPAGAPFNRLRAMLADLR QNAAFAG	AMP (0.98)
۳۴	Antihypertensive protein BDS-1	P11494	Anemonia sulcata	AAPCFCSGKPGRGLWILRGTCPPGGYGYTSNCY KWPNICCYPH	AMP (1)
۳۵	Beta-defensin	H6UWK5	Epinephelus coioides	NDPEMQYWTCGYRGLCRRFCHAQEYIVGHHGC PRRYRCCAVRS	AMP (1)
۳۶	Cicadin	P83282	Cicada flammata	NEYHGFVDKANNENKRRKKQGRDDFVVKPNNF ANRRRKKDDYENYDDVDAADV	NON-AMP (0/01)
۳۷	Antimicrobial peptide-57	Q6UWK7	Homo sapiens	KRRPAKAWSGRRRLCCHRVSPNSTNLKGHHV RLCKPCKLEP EPRLWVVPALPQV	AMP (0/99)
۳۸	Antiviral lectin scytovirin	P86041	Scytonema varium	GSGPTYCWNEANPPGGPNRCSNNKQCDGARTC SSSGFCQGTSRKPDPG PKGPTYCWDEAKNPPGGPNRCSNSKQCDGARTCS SSGFCQGTG GHAAA	(AMP (1)
۳۹	Antiviral protein Y3	P83477	Pleurotus citrinopileatus	AACARFIDDFCDTLTPNIYRPDNGQRCYAVNG HRCDFTVFN TNN GGNPIRASTPNCKTVLRTAANRCPTGGRGKINPN APFLFAIDPN DGDCSTNF	AMP (99)

مقادیر در مدل اولیه که توسط سرور I-TASSER پیش‌بینی شده بود، ۶۳٪، ۲۸٪ و ۳٪ بودند (شکل ۱).

درصد کمترین تعداد باقیمانده اسید آمینه آگریز را دارد.

بررسی داکینگ مولکولی بین پپتیدهای ضد ویروسی و پروتئین VP۲۸

بررسی برهمکنش احتمالی بین پروتئین VP۲۸ و پپتیدهای ضد ویروسی نهایی (*Ginkbilobin*، *Circulin-F*، *Cycloviolin-A*، *Cycloviolin-D*) با استفاده از سرور ClusPro ۲،۰ با دقت و موفقیت انجام شد (شکل ۲). نتایج اتصال مولکولی نشان داد که کمترین انرژی اتصال بین پپتیدهای *Ginkbilobin*، *Circulin-F*، *Cycloviolin-A*، *Cycloviolin-D*، *Circulin-C*، *Kalata-B8* و *Antiviral protein Y3* و پروتئین VP۲۸ به ترتیب ۱۰۲۸/۳-، ۳۶۷/۱-، ۷۴۰/۵-، ۷۷۴/۰-، ۷۷۰/۰-، ۷۶۳/۴- و ۸۴۷/۷- kcal/mol بود (جدول ۴).

تعیین و اعتبارسنجی سازه‌های درجه سوم

ساختارهای سوم هریک از پپتیدهای *Ginkbilobin*، *Circulin-F*، *Antiviral protein Y3* به ترتیب با بالاترین ضرایب اطمینان (C-score) ۱/۴۳، ۰/۳۴، ۰/۶۲، ۰/۶۰، ۰/۳۴، ۰/۸۳، ۱/۵۰ و پروتئین VP۲۸ با ضریب اطمینان ۰/۷۴- مدل‌سازی شدند. در مرحله بعد، برای دستیابی به دقیق‌ترین حالت تاخوری مدل سه بعدی پروتئین VP۲۸ ارائه شده، از سرور GalaxyRefine استفاده شد و سپس از بین ۶ مدل ارائه شده بهترین مدل با بکارگیری تجزیه و تحلیل Ramachandran تأیید شد. در مدل نهایی تصفیه شده از پروتئین VP۲۸ ۹۰٪، ۷٪، ۰٪ باقیمانده‌ها به ترتیب در مناطق هسته، مجاز و خارج قرار داشتند، در حالی که این

جدول ۲- خواص فیزیوشیمیایی پپتیدهای ضد ویروسی.

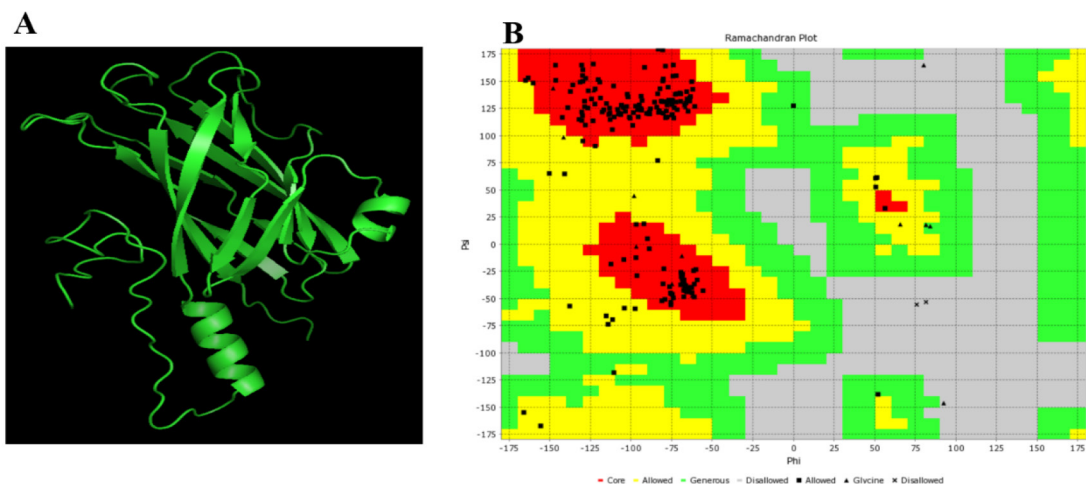
نام پپتید	طول	وزن مولکولی	pI	GRAVY	شاخص ناپایداری	شارژ خالص
Peptide Ctri9194	۱۵	۱۸۶۵/۱۷	۱۰/۷۴	-۰/۴۶۷	۱۰۴/۶۵	+۲
Beta-basrubin	۱۶	۱۹۵۲/۳۵	۱۰/۴۵	-۱/۰۶۲	۵۳/۵۴	+۴
Rhesus theta defensin-1/3, subunit A precursor	۱۸	۲۰۹۸/۵۸	۹/۰۱	۰/۵۲۲	۴۰/۹۵	+۴
Thaumatococcus-like protein , Actc2	۲۰	۲۱۴۰/۴۴	۵/۵۶	۰/۷۳۰	۲۸/۰۹	۰
NP-06	۲۱	۲۱۸۵/۵۳	۴/۸	۱/۱۵۷	۲۹/۷۸	-۱
Dermaseptin-3	۳۰	۳۰۲۳/۷۲	۱۰/۳۰	۰/۳۵۰	-۵/۲۸	+۵
Maximin 1	۳۷	۳۷۶۵/۱۶	۹/۸۳	۰/۲۵۲	۷/۰۳	+۳
Cycloviolon-B	۲۸	۲۹۱۰/۳۳	۵/۹۶	۰/۳۸۹	۶۸/۲۷	+۳
Circulin-D	۳۰	۳۴۲۰/۰۳	۶/۷۱	۰/۱۱۳	۱۵/۰۲	۰
Circulin-C	۳۰	۳۱۲۵/۷۲	۸/۳۳	۰/۵۶۰	۱۶/۱۷	+۲
Circulin-F	۲۹	۳۰۷۵/۷۰	۸/۳۴	۰/۶۲۵	۲۵/۸۰	+۲
Circulin-E	۳۰	۳۴۲۰/۰۳	۶/۷۱	۰/۰۹۰	۲۶/۷۹	۰
Kalata-B8	۳۱	۳۳۰۷/۸۱	۷/۶۷	۰/۱۲۳	۲۷/۵۳	+۱
Cycloviolon-A	۳۱	۳۲۳۵/۸۸	۸/۳۳	۰/۶۸۱	۲۸/۷۶	+۲
Neutrophil antibiotic peptide NP-4 precursor	۳۱	۳۳۳۸/۹۷	۸/۹۶	۰/۳۰۳	۲۸/۸۲	+۴
Antihypertensive protein BDS-1	۴۳	۴۷۱۴/۴۲	۸/۶۴	-۰/۳۰۹	۲۹/۱۸	+۳
Caerin-1.1	۲۵	۲۵۸۵/۱۳	۷/۰۲	۱/۱۸۸	۲۹/۷۰	۰
Reptilian Defensin	۳۶	۴۰۸۰/۹۸	۹/۳۹	۰/۶۰۸	۳۱/۶۰	+۷
Cycloviolon-C	۳۰	۳۱۶۶/۷۷	۸/۳۳	۰/۴۵۰	۳۲/۹۸	+۲
Cycloviolon-D	۳۰	۳۱۷۰/۷۶	۸/۳۳	۰/۵۰۷	۳۶/۷۷	+۲
Ginkbilobin	۴۰	۴۲۱۳/۷۵	۱۱/۷۱	-۰/۱۸۰	۳۷/۱۲	+۳
Neutrophil antibiotic peptide NP-3 precursor	۲۹	۳۲۸۱/۸۳	۹/۲۵	-۰/۱۶۹	۳۷/۳۹	+۵
Vhl-2	۳۰	۳۱۹۹/۶۳	۴/۳۷	۰/۰۴۳	۳۹/۲۱	-۱
Neutrophil cationic peptide 1 type B preproprotein	۳۰	۳۶۸۲/۳۹	۹/۴۹	۰/۰۵۷	۳۹/۳۵	+۶
Neutrophil defensin 3, Defensin-6	۳۰	۳۴۹۲/۱۰	۸/۳۳	۰/۱۲۳	۴۱/۰۶	+۲
Mytilin-B	۳۴	۳۹۸۱/۷۶	۹/۵۸	-۰/۳۴۴	۴۴/۳۰	+۹
Melittin	۲۶	۲۸۴۷/۴۹	۱۲/۰۲	۰/۲۷۳	۴۴/۷۳	+۵
Vhl-1	۳۱	۳۳۴۰/۹۴	۵/۸۵	۰/۶۹۰	۵۶/۱۲	۰
Palicourein	۳۷	۳۹۲۸/۴۳	۴/۷۸	-۰/۱۸۹	۶۰/۲۶	+۱
Corticostatin-6	۳۴	۴۰۵۱/۷۴	۹/۸۴	-۰/۳۴۴	۴۴۰/۹۶	+۷
Corticostatin-3 precursor	۳۳	۳۸۹۷/۷۹	۱۱/۴۰	-۰/۱۱۲	۸۴/۷۷	+۹

ادامه جدول ۲- خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدهای ضد ویروسی.

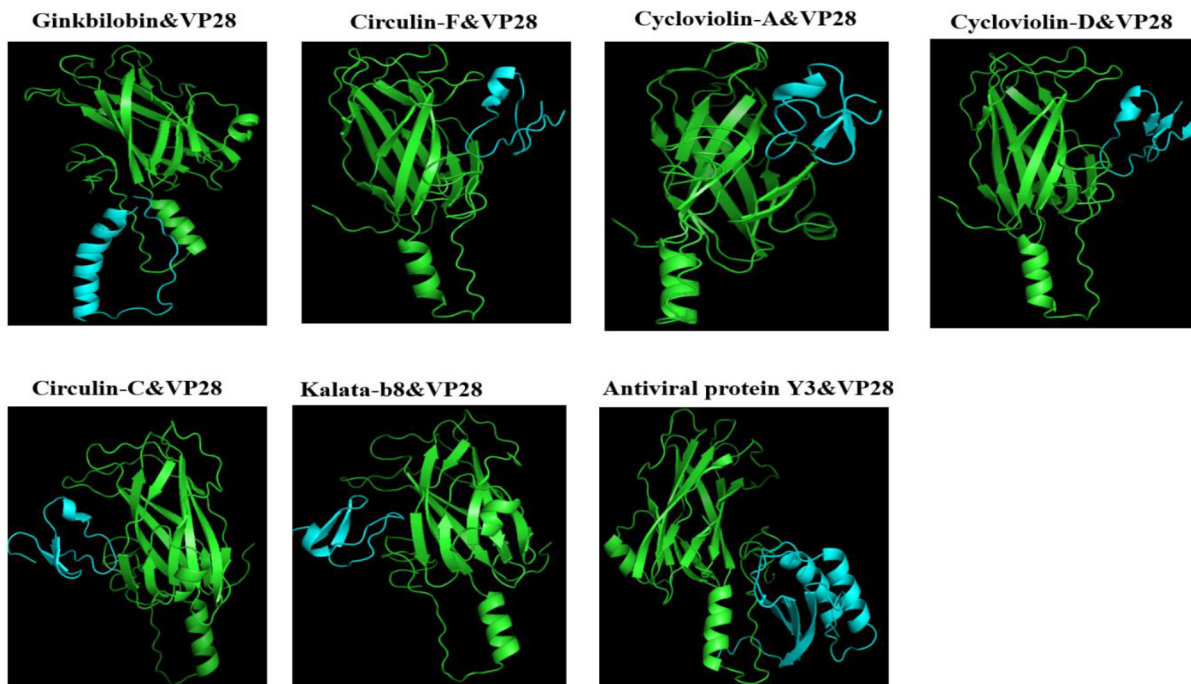
نام پپتید	طول	وزن مولکولی	pI	GRAVY	شاخص ناپایداری	شارژ خالص
Corticostatin-4 precursor	۳۳	۳۸۵۴/۷۶	۱۱/۱۲	-۰/۱۳۹	۸۷/۰۵	+۸
Human Defensin-5	۳۲۱	۳۵۸۸/۱۹	۸/۹۶	-۰/۱۱۳	۱۳/۷۹	+۴
Beta-defensin	۴۳	۵۱۷۹/۹۳	۸/۹۲	-۰/۸۰۲	۳۶/۱۱	+۴
Antimicrobial peptide-57	۵۷	۶۵۱۸/۷۵	۱۱/۲۸	-۰/۷۵۴	۷۱/۳۱	+۱۱
Antiviral lectin scytovirin	۹۵	۹۷۳۲/۴۸	۸/۵۹	-۱/۱۰۰	۳۰/۶۱	+۴
Antiviral protein Y3	۹۷	۱۰۵۷/۷۷	۸/۵۸	-۰/۵۶۹	۱۶/۷۸	+۳

جدول ۳- میزان آبگریزی و حلالیت پپتیدهای ضد ویروسی غربال شده از آنالیزهای خواص فیزیکوشیمیایی.

نام پپتید	شاخص حلالیت	درصد آبگریزی	% Acidic	% Basic	%Neutral	آلرژن بودن	سمیت
Dermaseptin-3	۰/۷۷۴ (محلول)	۵۳/۳۳	۳۳/۳۳	۲۰	۲۳/۳۳	آلرژن	غیر سمی
Ginkbilobin	۰/۶۳۸ (محلول)	۲۵/۵	۲/۵	۱۲/۵	۳۲/۵	غیر آلرژن	غیر سمی
Circulin-F	۰/۷۹۸ (محلول)	۴۱/۳۸	۳/۴۵	۱۰/۳۴	۴۴/۸۳	غیر آلرژن	غیر سمی
Maximin 1	۰/۷۱۰ (محلول)	۴۰/۷۴	۳/۷	۱۴/۸۱	۴۰/۷۴	آلرژن	غیر سمی
Cycloviolin-A	۰/۸۲۷ (محلول)	۳۸/۷۱	۳/۲۳	۹/۶۸	۴۸/۳۹	غیر آلرژن	غیر سمی
Cycloviolin-D	۰/۷۰۳ (محلول)	۳۶/۶۷	۳/۳۳	۱۰	۵۰	غیر آلرژن	غیر سمی
Circulin-C	۰/۸۱۸ (محلول)	۳۳/۳۳	۳/۳۳	۱۰	۵۳/۳۳	غیر آلرژن	غیر سمی
Cycloviolin-C	۰/۸۱۸ (محلول)	۳۳/۳۳	۳/۳۳	۱۰	۵۳/۳۳	آلرژن	غیر سمی
Antihypertensive protein BDS-1	۰/۷۰۷ (محلول)	۳۲/۵۶	۲/۳۳	۱۱/۶۳	۵۳/۴۶	غیر آلرژن	سمی
Neutrophil antibiotic peptide NP-4 precursor	۰/۶۳۱ (محلول)	۳۹/۰۳	۳/۲۳	۱۶/۱۳	۵۱/۶۱	آلرژن	غیر سمی
Reptilian Defensin	۰/۶۳۸ (محلول)	۳۷/۷۸	۵/۵۶	۳۷/۷۸	۳۸/۸۹	آلرژن	سمی
Neutrophil cationic peptide 1 type B preproprotein	۰/۶۳۷ (محلول)	۲۶/۶۷	۰	۲۰	۵۳/۳۳	غیر آلرژن	سمی
Neutrophil antibiotic peptide NP-3 precursor	۰/۶۶۳ (محلول)	۳۰/۶۹	۳/۴۵	۳۰/۶۹	۵۵/۱۷	آلرژن	غیر سمی
Kalata-B8	۰/۷۱۵ (محلول)	۱۶/۱۳	۴/۴۵	۹/۶۸	۶۷/۷۴	غیر آلرژن	غیر سمی
Human Defensin-5	۰/۷۲۵ (محلول)	۲۱/۸۸	۶/۲۵	۱۸/۷۵	۵۳/۱۳	آلرژن	سمی
Beta-defensin	۰/۵۷۵ (محلول)	۲۵/۵۸	۶/۹۸	۲۳/۲۶	۱۹۴۴	غیر آلرژن	سمی
Antiviral lectin scytovirin	۰/۷۵۹ (محلول)	۲۲/۱۱	۶/۳۲	۱۱/۵۸	۶۰/۰۰	آلرژن	سمی
Antiviral protein Y3	۰/۵۶۵ (محلول)	۳۶/۰۸	۸/۲۵	۱۲/۳۷	۴۳/۳	غیر آلرژن	غیر سمی



شکل ۱ - A- پیش بینی ساختار سوم پروتئین VP28 بعد از ریفاین کردن. B: نمودار رامچاندرا ن مربوط به ساختار سوم پروتئین VP28 بعد از ریفاین کردن.

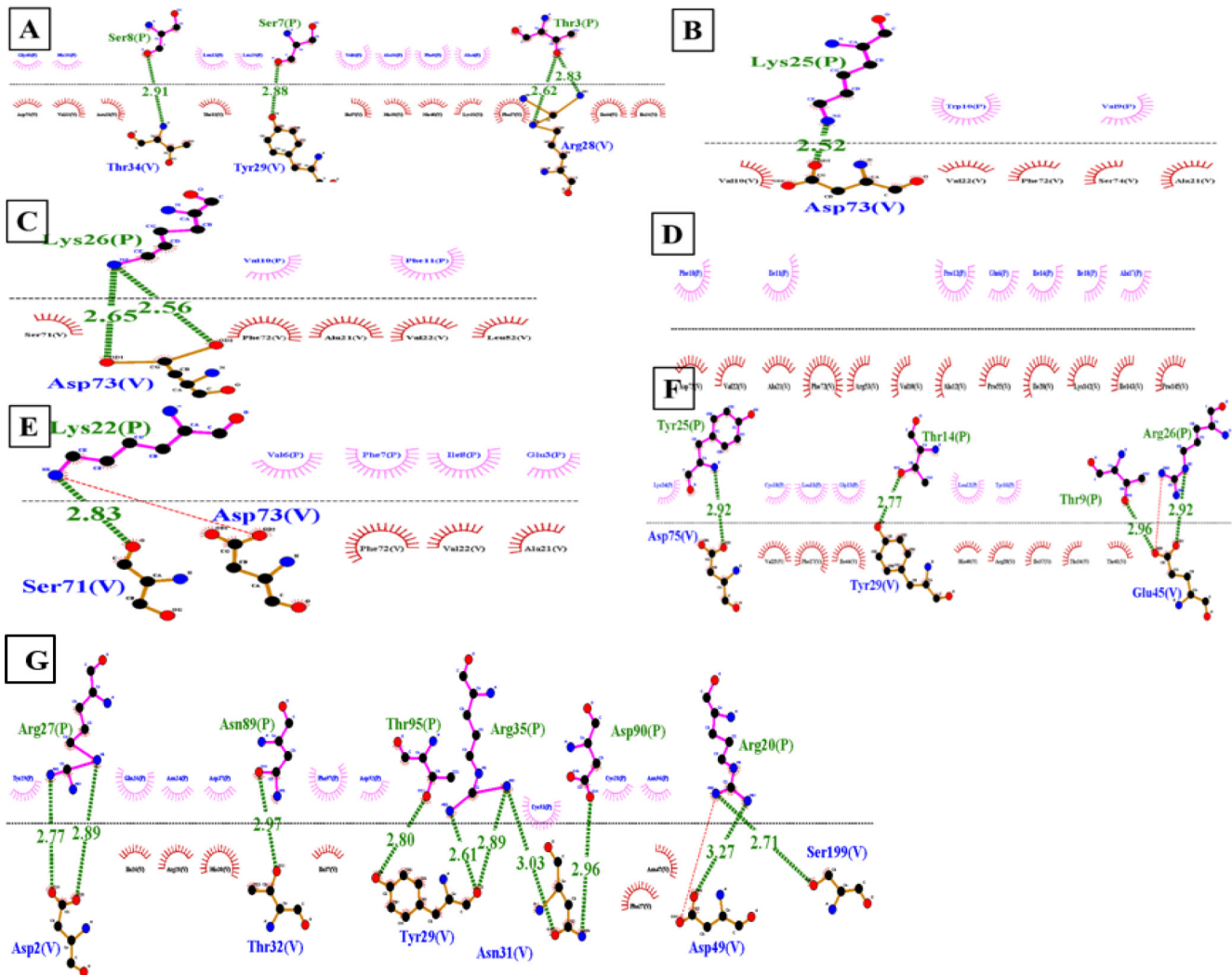


شکل ۲- داکینگ مولکولی بین پپتیدهای نهایی ضد ویروسی و پروتئین VP28 از ویروس سندروم لکه سفید. رنگ سبز مربوط به پروتئین VP28 از ویروس سندروم لکه سفید است و رنگ آبی مربوط به پپتیدهای ضد ویروسی انتخاب شده در این مطالعه می باشد.

بحث

WSSV که یک ویروس dsDNA پوششی است که مهم‌ترین پاتوژن اقتصادی میگوی پرورشی در سراسر جهان است (۲). پروتئین VP۲۸ که عامل اصلی اتصال WSSV به سطح سلول‌های میگوها می‌باشد، نقش مهمی را در نفوذ ویروس به درون سلول میزبان ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد این

تجزیه و تحلیل بیشتر برای تعیین تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی با استفاده از نرم افزار LigPlot+ ورژن ۲/۲/۸ انجام شد. بر اساس نتایج، از بین پپتیدهای ذکر شده، پپتید Cycloviolin-D قادر به تشکیل هیچ نوع پیوندی با پروتئین VP۲۸ نبود در حالی که پپتیدهای *Ginkbilobin*، *Antiviral* و *Circulin-F*، *Cycloviolin-A*، *Circulin-C*، *Kalata-B8* به ترتیب ۴، ۱، ۲، ۱، ۴ و ۱۰ پیوند هیدروژنی با پروتئین VP۲۸ تشکیل داده‌اند (جدول ۵، شکل ۳).



شکل ۳- نمایش پیوندهای هیدروژنی بین اسید آمینه‌های پپتیدهای ضد ویروسی و پروتئین VP۲۸ توسط نرم افزار LigPlot+.

تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی حاصل از ارزیابی‌های داکینگ مولکولی پروتئین VP۲۸ و پپتیدهای ضد ویروسی، A، B، C، D، E، F و G به ترتیب مربوط به داکینگ مولکولی پپتیدهای ضد ویروسی *Kalata-B8*، *Circulin-C*، *Cycloviolin-D*، *Cycloviolin-A*، *Circulin-F*، *Ginkbilobin*، *Antiviral* پروتئین VP۲۸ از ویروس سندرم لکه سفید می باشد. اتم‌های کربن با رنگ سیاه، اکسیژن با رنگ قرمز و نیتروژن با رنگ آبی نمایش داده شده است. پیوندهای هیدروژنی به رنگ سبز و پیوندهای یونی به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند. در این شکل اسید آمینه‌های مربوط به پپتیدهای ضد ویروسی به رنگ سبز و حرف "P" و اسید آمینه‌های مربوط به پروتئین VP۲۸ به رنگ آبی و حرف "V" مشاهده می‌شود.

جدول ۴- آنالیز داکینگ مولکولی هر یک از پپتیدهای ضد ویروسی منتخب و پروتئین VP28.

نام پپتید	تعداد خوشه‌های تشکیل شده	کمترین اثری اتصال خوشه‌های تشکیل شده (کیلوکالری بر مول)	اثری اتصال مرکز خوشه (کیلوکالری بر مول)
<i>Ginkbilobin</i>	۲۶۴	-۱۰۲۸/۳	-۹۳۹/۱
<i>Circulin-F</i>	۲۵۸	-۳۶۷/۱	-۶۵۶/۸
<i>Cycloviolin-A</i>	۲۸۰	-۷۴۰/۵	۷۰۲/۱
<i>Cycloviolin-D</i>	۲۴۹	-۷۷۴/۰	-۶۷۹/۱
<i>Circulin-C</i>	۳۵۵	-۷۷۰/۰	-۶۷۷/۵
<i>Kalata-B8</i>	۳۲۲	-۷۶۳/۴۱	-۶۵۰/۵
<i>Antiviral protein Y3</i>	۲۰۵	-۸۴۷/۷	-۷۴۸/۰

جدول ۵- لیست اسید آمینه‌های شرکت کننده در پیوند هیدروژنی هر یک از پپتیدهای ضد ویروسی منتخب و پروتئین VP28.

نام پپتید	اسید آمینه‌های پپتیدهای ضد ویروسی	اسید آمینه‌های پروتئین VP28	طول پیوند هیدروژنی (انگستروم)
<i>Ginkbilobin</i>	سرین ۸	ترئونین ۳۴	۲/۹۱
	سرین ۷	تیروزین ۲۹	۲/۸۸
	ترئونین ۳	آرژنین ۲۸	۲/۶۲ & ۲/۸۳
<i>Circulin-F</i>	لیزین ۲۵	آسپارتیک اسید ۷۳	۲/۵۲
<i>Cycloviolin-A</i>	لیزین ۲۶	آسپارتیک اسید ۷۳	۲/۵۶ & ۲/۶۵
<i>Cycloviolin-D</i>	-	-	-
<i>Circulin-C</i>	لیزین ۲۲	سرین ۷۱	۲/۸۳
<i>Kalata-B8</i>	تیروزین ۲۵	آسپارتیک اسید ۷۵	۲/۹۲
	تریپتوفان ۱۴	تیروزین ۲۹	۲/۷۷
	تیروزین ۹	گلوتامین ۴۵	۲/۹۶
	آرژنین ۲۶	گلوتامین ۴۵	۲/۹۲
<i>Antiviral protein Y3</i>	آرژنین ۲۷	آسپارتیک اسید ۲	۲/۸۹ & ۲/۷۷
	آسپارژین ۸۹	ترئونین ۳۲	۲/۹۷
	تیروزین ۹۵	تیروزین ۲۹	۲/۸۰
	آرژنین ۳۵	تیروزین ۲۹	۲/۸۹ & ۲/۶۱
	آرژنین ۳۵	آسپارژین ۳۱	۳/۰۳
	آسپارتیک اسید ۹۰	آسپارژین ۳۱	۲/۹۶
	آرژنین ۲۰	آسپارتیک اسید ۴۹	۳/۳۷
	آرژنین ۲۰	سرین ۱۹۹	۲/۷۱

پروتئین می‌توانند ویروس را خنثی کرده و عفونت ویروسی را مهار نمایند (۱۰). در حالی که پیشرفت‌های علمی در مقیاس بزرگ منجر به تولید و توزیع گسترده واکسن‌ها و داروهای ضدویروسی شده است، اما هنوز ویروس‌ها یکی از عوامل اصلی بیماری‌های انسانی امروزی هستند. گزارش‌های روزافزون مقاومت ویروسی و ظهور مجدد اپیدمی‌های ویروسی جامعه بهداشتی و علمی را تحت فشار قرار می‌دهد تا دائماً مولکول‌های جدیدی با پتانسیل ضد ویروسی پیدا کنند. این جستجو شامل رویکردهای متعددی است و استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی خود را به عنوان یک جایگزین ارزشمند معرفی کرده است (۱۵). AMPs مولکول‌های بیولوژیکی کوچکی هستند که از طریق حمله به میکروارگانیسم‌ها، حفظ هموستاز دستگاه گوارش و تعدیل پاسخ‌های التهابی در مکانیسم‌های دفاعی موجودات دخیل هستند، این ترکیبات هم در یوکاریوت‌ها و هم پروکاریوت‌ها یافت می‌شوند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی (ضدباکتری، ضدویروس و ضدقارچ) را از خود نشان دادند (۱۶). تحقیقات نشان داده است که برخی پپتیدها، می‌توانند فعالیت ضدویروسی قابل توجهی را، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط تجربی از طریق ارتباط مستقیم با ویروس نشان دهند. پپتیدها از طرق مختلفی می‌توانند ویروس‌ها رو نابود کنند، که از جمله این روش‌ها می‌توان به غیرفعال کردن ویروس، ممانعت از ورود ویروس به سلول‌ها، تعامل با گیرنده‌های خاص سلول درگیر یا با متوقف کردن پروتئین‌های ویروسی که با سلول‌های هدف مرتبط می‌شوند، اشاره کرد (۱۷، ۱۸). اگرچه تعداد پپتیدهای ضد میکروبی با فعالیت ضدویروسی هنوز کم است، ولی در حال حاضر پتانسیل زیادی برای تبدیل شدن به داروهای ضدویروسی نشان می‌دهند. چنین پپتیدهایی می‌توانند از منابع طبیعی، مانند منابع جدا شده از پستانداران و زهر حیوانات، یا از منابع مصنوعی، زمانی که از ابزار بیوانفورماتیک استفاده می‌شود، منشاء بگیرند (۱۵). نحوه دقیق عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی مشخص نشده است، اما تمام پپتیدهای آمفی‌پاتیک کاتیونی با غشا برهمکنش دارند چرا که غشای سیتوپلاسمی هدف اصلی برخی از پپتیدها است، به طوری که تجمع پپتید در غشاء باعث افزایش نفوذپذیری و از دست دادن عملکرد می‌شود (۱۹). تاکنون برخی فاکتورها شناسایی شده‌اند که برای فعالیت ضد میکروبی پپتیدها مهم هستند، از جمله آن‌ها می‌توان به آبگریز بودن پپتید، وجود باقیمانده‌هایی با بار مثبت، ماهیت آمفی‌پاتیک که بقایای پایه و آبگریز را جدا می‌کند و ساختار ثانویه پپتیدها اشاره داشت (۲۰، ۲۱). همانطور که در بخش گزارش نتایج مربوط به خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدها در این مطالعه ملاحظه می‌شود پپتیدهایی که دارای بار منفی یا صفر بودند حذف شدند زیرا نمی‌توانند به در سطح غشای سلول به بخش سر مولکول‌های فسفولیپید که حاوی بار منفی هستند متصل شوند (۲۲). همچنین پپتیدهایی که شاخص GRAVY منفی نیز از دامه بررسی در این مطالعه حذف گردیدند زیرا این شاخص نشان‌دهنده آبگریزی با آبدوسی باقی‌مانده‌های اسید آمینه را نشان می‌دهد و اگر این شاخص مثبت باشد آبگریز بودن اسید آمینه‌های تشکیل دهنده یک پپتید را تایید می‌کند، این درحالی است که منفی بودن این شاخص احتمال کروی یا آبدوست بودن یک پپتید را در مقابل آبگریز یا غشایی بودن آن

نشان می‌دهد (۲۳). علاوه بر این پپتیدهایی که شاخص ناپایداری بالای ۴۰ را ارائه کردند نیز حذف شدند زیرا بر اساس مطالعاتی که توسط سررو ProtProm روی پروتئین‌های مشخص پایدار و ناپایدار انجام شده است مشخص شده که وقوع یک دی‌پپتید خاص ناپایداری قابل توجهی در یک پروتئین ایجاد می‌کند، بنابراین می‌توان بر اساس مقدار وزنی این دی‌پپتید شاخص ناپایداری را تعریف کرد. این سرور پروتئین‌هایی را پایدار اعلام می‌کند که مقدار این شاخص در آن‌ها زیر ۴۰ باشد. آنتی‌ژنیسته به عنوان توانایی یک مولکول بیگانه برای القای پاسخ ایمنولوژیک زمانی که بدن میزبان با آن مواجه می‌شود، در نظر گرفته می‌شود. آنتی‌ژنیسته شامل دو نوع ویژگی ایمنی، یعنی ایمنی‌زایی و حساسیت‌زایی است. ایمنی‌زایی به توانایی یک آنتی‌ژن برای تحریک پاسخ‌های ایمنی طبیعی و محافظتی پس از مواجهه با بدن اشاره دارد که از سه جنبه زیر توصیف می‌شود؛ (۱) توانایی سیستم ایمنی برای دفاع از بدن که مربوط به دفع آنتی‌ژن آگروژن و مقابله با عفونت است. (۲) توانایی پایدار نگه داشتن سیستم ایمنی (هموستاز ایمنولوژیک)، که مربوط به توانایی بدن برای تشخیص و حذف بافت آسیب دیده، التهاب و/یا سلول‌های پیر می‌شود. (۳) توانایی حذف سلول‌های جهش یافته‌ی غیرطبیعی به منظور نظارت و مهار رشد بدخیمی‌ها در بدن (نظارت ایمنولوژیک). این درحالی است که آلرژی‌زایی به توانایی یک آنتی‌ژن برای القای یک پاسخ ایمنی غیرطبیعی اشاره دارد که یک واکنش بیش از حد است و با یک پاسخ ایمنی طبیعی متفاوت است زیرا منجر به یک اثر محافظتی/پیشگیری نمی‌شود، بلکه باعث اختلال عملکرد فیزیولوژیکی یا آسیب بافت می‌شود (۲۴). بنابراین در این پژوهش یکی از ارزیابی‌های مهم انجام شده شناسایی پپتیدهای آلرژن و حذف آن‌ها بود که با موفقیت انجام شد. نظریه پوشش و آنالیز AMPها به منظور یافتن پپتیدهای مناسب برای مهار برخی پاتوژن‌ها پیش از این نیز مورد توجه محققین بوده است به طوری که محققین برخی از محتمل‌ترین AMPهای مهارکننده پروتئین VP1 از ویروس تب برفکی را که بالاترین افینیتی اتصال به این پروتئین داشتند را معرفی کردند که قادر بودند این پروتئین را غیرفعال کنند و مانع از اتصال ویروس تب برفکی به سطح سلول‌های میزبان می‌شوند (۲۵). علاوه بر این در مطالعه دیگری محققین یک پپتید ۳۶ اسید آمینه‌ای به نام CLF۳۶ معرفی کردند و با ارزیابی‌های بیوانفورماتیک نشان دادند که این پپتید قادر است با مهار پروتئین‌های مربوط به آنتی‌ژن‌های هم‌گلوتینین (HA)، نورآمینیداز (NA) و پروتئین ماتریکس ۲ (M2) از ویروس آنفلانزا تیپ H5N1، مانع از ورود و انتشار این ویروس در بدن میزبان شود (۲۶). در مطالعه دیگری نیز محققین با هدف مهار پاتوژن اشرشیاکلی آلوده‌کننده پرندگان، یک بیماری عفونی جدی در صنعت طیور است، روی گروهی از AMP مطالعه کردند و گزارش کردند که پپتید Manduca Sexta Moric قادر به ایجاد اتصالات قوی هیدروژنی با پروتئین fimH از باکتری اشرشیاکلی است که به راحتی می‌تواند مانع از ورود این پاتوژن و شیوع بیماری عفونی منتج شده از این باکتری شود (۲۷). بیوانفورماتیک یک حوزه بین رشته‌ای از علم است که از زیست‌شناسی، ریاضیات و علوم کامپیوتر تشکیل شده است به عبارتی دیگر، بیوانفورماتیک کاربرد فناوری اطلاعات برای مدیریت

4. Dashtiannasab A. White spot syndrome virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*: Elsevier; 2020. p. 717-28.
5. Dashtiannasab A. White spot disease and ways to prevent it. *Journal of Shrimp and Crustaceans*. 2016;1(2):4-7.
6. Zhu F, Zhang X. Protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) with β -1, 3-D-glucan-encapsulated vp28-siRNA particles. *Marine biotechnology*. 2012;14:63-8.
7. Motamedi Sedeh F, Afsharnasab M, Heidarieh M, Shafae S, Rajabifar S, Dashtiannasab A, et al. Titration of the Iranian White Spot Virus isolate, on Crayfish *Astacus leptodactylus* and *Penaeus semisulcatus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2012;11(1):145-55.
8. Mohan C, Corsin F, Thakur P, Padiyar P, Madhusudan M, Turnbull J, et al. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection. *Diseases of aquatic organisms*. 2002;50(1):1-8.
9. van Hulten MC, Witteveldt J, Snippe M, Vlak JM. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 2001;285(2):228-33.
10. Yi G, Wang Z, Qi Y, Yao L, Qian J, Hu L. Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *BMB Reports*. 2004;37(6):726-34.
11. Tang X, Wu J, Sivaraman J, Hew CL. Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *Journal of virology*. 2007;81(12):6709-17.
12. Kumar S, Verma AK, Singh SP, Awaṣṡhi A. Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(10):25325-43.
13. Gholamhosseini A, Taqdasī V, Samadipour M, Bojarzadeh H. A review of new methods of dealing with white spot disease in shrimp. *The 11th congress of veterinary students of Iran 2017*.
14. Tsai J-M, Wang H-C, Leu J-H, Hsiao H-H, Wang AH-J, Kou G-H, et al. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of virology*. 2004;78(20):11360-70.
15. Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76:3525-42.
16. Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(5):603.
17. Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, Nash AA, York IA,

داده‌های بیولوژیکی است که به رمزگشایی ژنوم کمک می‌کند. این حوزه به عنوان ابزاری برای تسهیل اکتشافات بیولوژیکی بیش از چند دهه است که ظهور کرد (۲۸). امروزه نیز ابزارهای بیوانفورماتیک به طور گسترده‌ای در بخش‌های مختلف زیست‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا استفاده از این دانش نه تنها هزینه آزمایش‌ها را کاهش می‌دهد، بلکه نتایج قابل اعتمادی نیز ارائه می‌دهد. بنابراین بکارگیری بستر کاربرپسند و در دسترس بیوانفورماتیک در حوزه‌های مختلف علوم زیستی همانند مطالعه پیش رو در ارزیابی پپتیدهای کوچک و ایمن با هدف رسیدن به جایگزین مناسب دارو یا واکسن برای مهار ویروس مهلک سندروم لکه سفید در میگوهای پرورشی، می‌تواند چشم‌انداز روشنی را پیش از شروع مطالعات درون آزمایشگاهی یا درون‌تنی با هدف پیشگیری از شیوع این ویروس به وجود آورد.

نتیجه‌گیری کلی

پپتید *Antiviral protein Y3* به طول ۹۹ اسید آمینه که ۳۶/۰۸ درصد از آنها خاصیت آبگریزی داشتند توانست ده پیوند هیدروژنی با پروتئین VP۲۸ برقرار کند که این تعداد از پیوندهای هیدروژنی می‌تواند رابطه مستقیمی با تعداد اسید آمینه‌های این پپتید داشته باشد. درحالی که کمترین درصد اسید آمینه‌های آبگریز مربوط به پپتید *Kalata-B8* بود که دارای ۴ پیوند هیدروژنی با پپتید *VP28* بود که درست با تشکیل همین تعداد پیوند هیدروژنی، پپتید *Ginkbilobin* است که با طول مناسب ۴۰ اسید آمینه دارای ۲۵/۵٪ اسید آمینه‌های آبگریز است. بنابراین با هدف سنتز و بکارگیری این پپتیدها در مطالعات *in vitro* و *in vivo* باشد، به نظر می‌رسد که (بعد اجرا و تایید مطالعات دینامیک مولکولی) استفاده از دو پپتید *Antiviral protein Y3* و *Ginkbilobin* امید بخش باشند.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله به این وسیله اعلام می‌دارند که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد. لازم به ذکر است مقاله حاضر، مستخرج از طرح پژوهشی تصویب شده در جلسه شورای پژوهشی دانشگاه لرستان با شماره نامه ۲۹۸۸۰ می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Lo C-F, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of aquatic organisms*. 1996;27(3):215-25.
2. Flegel T. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 2006;258(1-4):1-33.
3. Afsharnasab M, Dashtyannasab A, Yeganeh V, Soltani M. Incidence of white spot disease (WSD) in *Penaeus indicus* Farms in Bushehr province, Iran. 2007.

- Pohl J, et al. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PloS one*. 2011;6(10):e25333.
18. Tripathi S, Teele T, Verma A, Crouch E, White M, Hartshorn KL. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 1):40.
19. Ciumac D, Gong H, Hu X, Lu JR. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science*. 2019;537:163-85.
20. Hof Wvt, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AVN. Antimicrobial peptides: properties and applicability. 2001.
21. Wagenlehner F, Naber K. New drugs for Gram-positive uropathogens. *International journal of antimicrobial agents*. 2004;24:39-43.
22. Marassi FM, Opella SJ, Juvvadi P, Merrifield R. Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical journal*. 1999;77(6):3152-5.
23. Enany S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. *Journal of infection and public health*. 2014;7(4):296-307.
24. Zhang J, Tao A. Antigenicity, immunogenicity, allergenicity. *Allergy bioinformatics*. 2015:175-86.
25. Forouharmehr A, Nazifi N, Jaydari A. Restraint of VP1 Protein of Foot and Mouth Disease Virus using Specific Antiviral Peptides: an in Silico Investigation. *Archives of Razi Institute*. 2023;78(5):1483-94.
26. Sahebazar A, Mohtaba T, Sekhavati MH. Molecular docking CLF36 peptide against avian influenza virus subtype H5N8 antigens. *Veterinary Research & Biological Products*. 2021;34(4):54-65.
27. Shams N, Forouharmehr A, Nazifi N, Jaydari A, Rashidian E. A Comprehensive Computational Analysis for Identification of a Specific Anti-avian Pathogenic *Escherichia coli* Peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2022;28(2):48.
28. Wani MY, Ganie N, Rani S, Mehraj S, Mir M, Baqual M, et al. Advances and applications of Bioinformatics in various fields of life. *Int J Fauna Biol Stud*. 2018;5(2):03-10.

