



## بررسی اثر ضد باکتریایی پروتئین و پپتیدهای زیست فعال آلفا s1 کازئین شیر بر باکتری‌های مولد ورم‌پستان در گونه‌های مختلف پستانداران به روش داکینگ مولکولی

حجت‌اله یامی<sup>۱</sup>، \*مجتبی طهمورث پور<sup>۲</sup>، مرجان ازغندی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری و <sup>۲</sup>آستاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۶

### چکیده

**سابقه و هدف:** به‌طور کلی عوامل ایجادکننده‌ی ورم پستان به دو دسته عوامل واگیردار (استافیلوکوکوس اورئوس) و عوامل محیطی (اشرشیاکلاسی) تقسیم‌بندی می‌شود. رایج‌ترین راه درمان این بیماری استفاده از آنتی بیوتیک‌هاست که می‌تواند موجب بروز مشکلاتی مرتبط با سلامت انسان شود. پپتیدهایی که در محیط آزمایشگاهی یا در موجودات زنده از هضم ناقص پروتئین‌ها ایجاد و دارای عملکرد زیستی خاص باشند را اصطلاحاً پپتیدهای زیست فعال می‌نامند. کازئین حاوی پپتیدهای ضد باکتریایی به نام ایزراسیدین می‌باشد که از طریق تخریب غشای سلولی یا غشای میتوکندری باعث نابودی سلول‌های باکتریایی می‌شود. هدف از انجام این پژوهش، شناسایی پروتئین و پپتیدهای زیست فعال ضدباکتریایی پروتئین آلفا s1 کازئین در هشت گونه مختلف از پستانداران و مقایسه خاصیت ضدباکتریایی این پپتیدها در این هشت گونه از پستانداران در مقابله با دو باکتری مهم مولد یعنی ورم پستان استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلاسی بود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی برای هشت گونه مختلف پستانداران (گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسان، گاو میش و خوک) از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری صورت گرفت و پس از آن پیش‌بینی پپتیدهای زیست فعال پروتئین آلفا s1 کازئین و ساختار سه بعدی آن‌ها با کمک نرم افزارهای آنلاین ACCLUSTERServer، I-TASSER و GalaxyWEB انجام شد. برای بررسی پایداری پروتئین و پپتیدها در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول) از نرم افزارهای آنلاین 3Drefine و YASARA استفاده گردید. در نهایت شبیه‌سازی برهمکنش (داکینگ) پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین با باکتری‌های مولد ورم پستان در درون سلول با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClusPro2.0 انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی برهمکنش مولکولی این پروتئین و پپتیدهای زیست فعال آن در هشت گونه مختلف از پستانداران با پروتئین‌های سطحی غشاء دو باکتری مهم مولد ورم پستان نشان داد که شیر گوسفند و خوک دارای بالاترین عملکرد در در نابودی باکتری استافیلوکوکوس، شیر انسان و گاو میش نیز بهترین عملکرد در مقابله با باکتری اشرشیا کلاسی و جلوگیری از بیماری ورم پستان را دارا هستند.

**نتیجه‌گیری:** بنابراین به نظر می‌رسد که می‌توان از پپتیدهای ایزراسیدین به عنوان عامل طبیعی و مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک برای کاهش اثرات مخرب بیماری ورم‌پستان بر سلامت انسان از طریق امکان انتقال سویه‌های باکتریایی مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک از

\*نویسنده مسئول: [m\\_tahmoorespur@yahoo.com](mailto:m_tahmoorespur@yahoo.com)

دام به انسان و همچنین افزایش کیفیت شیر مصرفی (کاهش تعداد سلول‌های بدنی در شیر، افزایش تولید شیر و آسیب کمتر به بافت پستانی) استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** ورم پستان، پروتئین آلفا S1 کازئین، پپتیدهای زیست فعال، برهمکنش مولکولی

### مقدمه

ورم پستان از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های صنعت گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی ناشی از آن چشم‌گیر است و سهم قابل توجهی از هزینه‌های درمانی گاو‌داری‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. از عوامل باکتریایی رایج در ایجاد این بیماری می‌توان به باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس، باکتری‌های گرم منفی مانند گونه‌های *اشرشیاکلا* اشاره کرد. رایج‌ترین راه درمان این بیماری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست که متأسفانه این خود علاوه بر زیان‌های اقتصادی، می‌تواند موجب بروز مشکلات مرتبط با سلامت انسان نیز شود. از جمله این مشکلات می‌توان به ایجاد اختلال در سیستم گوارشی انسان و اثرات سوء به علت مصرف فرآورده‌های لبنی حاوی پسماندهای دارویی ناشی از درمان و انتقال سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک حاصل از عدم استفاده درست داروها از دام به انسان اشاره کرد (۳، ۱۰ و ۲۲).

در طول دو دهه‌ی گذشته گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم، از گیاهان و حیوانات استخراج شدند و فعالیت‌های ضد میکروبی از خود نشان دادند که اصطلاحاً به آن‌ها پپتیدهای ضد میکروبی<sup>۲</sup> گفته می‌شود. محققان این پپتیدهای ضد میکروبی را آنتی‌بیوتیک طبیعی نامیدند و اظهار داشتند که آن‌ها می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند (۲۰). از جمله پروتئین‌های دارای پتانسیل ضد باکتریایی می‌توان به

کازئین اشاره کرد. کازئین یکی از پروتئین‌های اصلی شیر می‌باشد که حدود ۸۰ درصد از کل پروتئین‌های شیر را به خود اختصاص می‌دهد و به عنوان پروتئین غالب شیر به ۴ گروه آلفا، بتا، گاما و کاپا تقسیم می‌شود که دارای خاصیت کاهندگی فشارخون، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی، توانایی انتقال مواد معدنی و خاصیت ضد سرطانی می‌باشد (۱۱ و ۲۴). کازئین حاوی پپتیدهای ضد باکتریایی می‌باشد که از طریق اتصال این ترکیبات با بار مثبت به غشا آنیونیک باکتری از طریق تعاملات الکترواستاتیک و ایجاد اختلال در آن سبب تخریب غشای سلولی یا غشای میتوکندری باعث نابودی سلول‌های باکتریایی می‌شوند (۹، ۵ و ۱۲).

پروتئین آلفا S1 کازئین و پپتید شناسایی شده از آن با نام ایزراسیدین<sup>۳</sup> از خانواده پروتئین کازئین شیر می‌باشد که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای بالا، دارای ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله خاصیت آنتی‌باکتریایی می‌باشد به طوری که بخش انتهایی آمینو آن سبب محافظت موش‌ها علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکانس*<sup>۴</sup> می‌شود. این پپتید همچنین گوسفند و گاو در برابر ورم پستان در هنگام تزریق به پستان در سطوح قابل مقایسه با آنچه که با درمان استاندارد آنتی‌بیوتیک مشاهده می‌شود را محافظت می‌کند (۱۹، ۱۶ و ۲۵).

در پژوهش کان و همکارانش ۲۰۰۶، پپتید جدیدی از آلفا S1 کازئین گاوی شناسایی شد که طی هیدرولیز سدیم کازئینات گاوی توسط پپسین بدست

3. Isracidin

4. *Candida albicans*

2. Anti Microbial Peptids

خواص فیزیکی‌وشیمیایی: آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب دوستی و آب گریزی و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین در هشت گونه مختلف از پستانداران با استفاده از نرم افزار 5 CLC Main Workbench انجام شد.

مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین: مقایسه هم ردیفی<sup>۸</sup> توالی‌های پروتئین آلفا s1 کازئین برای هشت گونه مختلف از پستانداران با استفاده از نرم افزار 5 CLC Main Workbench انجام شد.

پیش‌بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیست فعال در ۸ گونه مختلف از پستانداران: ابتدا با بررسی تحقیق‌های انجام شده، توالی پپتیدهای ثبت شده برای پپتید ایزراسیدین از مقالات مختلف استخراج شد و سپس براساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی در نرم‌افزار 5 CLC Main Workbench و همچنین با استفاده از

نرم‌افزارهای آنالیز PeptiMap Server (https://peptimap.cluspro.org) و ACCLUSTER

Server (https://zougrouptoolkit.missouri.edu/accluster)

جایگاه‌های فعال پروتئین‌ها که احتمال تبدیل شدن به یک پپتیدزیست فعال را دارد برای هر هشت گونه مختلف از پستانداران شناسایی گردید (۲، ۴ و ۷) و در پایان فایل بانک اطلاعات پروتئین<sup>۹</sup> برای تمامی توالی‌های پپتیدی با استفاده از نرم‌افزار Pymol 1.2r1 تهیه و ذخیره شد.

می‌آید. این قطعه جدید فعالیت وسیعی علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌های گرم مثبت و منفی نشان داده است (۲۵). همچنین یافته‌های ون و همکاران ۲۰۰۰، نشان می‌دهد که پپتیدهای ضدباکتری مشتق شده از آلفا s1 کازئین فعالیت مهاری در برابر اترترو باکترها دارند. مطالعات آزمایشگاهی<sup>۵</sup> قطعه ۳۹ اسیدآمینه‌ای جدا شده از انتهای کربوکسیلی آلفا s1 کازئین گاوی نشان می‌دهد که رشد گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلاسی را مهار می‌کند (۲۶).

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی پروتئین و پپتیدهای زیست فعال ضدباکتریایی پروتئین آلفا s1 کازئین در هشت گونه مختلف از پستانداران و مقایسه خاصیت ضدباکتریایی این پپتیدها در این هشت گونه از پستانداران در مقابله با دو باکتری مهم مولد ورم‌پستان یعنی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلاسی بود.

### مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی: پروتئین آلفا s1 کازئین توسط ژن CSN<sub>1</sub>S<sub>1</sub> در موجودات مختلف کددهی می‌شوند. جدول ۱ توالی نوکلئوتیدی ژن CSN<sub>1</sub>S<sub>1</sub> و جدول ۲ توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین در هشت گونه مختلف از پستانداران (گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسان، گاو میش و خوک) را نشان می‌دهد که از پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری<sup>۶</sup> (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج شده‌اند. توالی‌های استفاده شده در این پژوهش اکثر از نوع توالی‌های مرجع<sup>۷</sup> بودند که بلندترین و کوتاه ترین قطعه پپتیدی به ترتیب مربوط به خوک و انسان بود (جدول ۱).

5. In vitro
6. National Center for Biotechnology Information
7. Reference Sequences

8. Alignment
9. Protein Data Bank

جدول ۱: طول توالی کدشونده ژن CSN1S1 و شماره دسترسی آن در بانک اطلاعاتی

**Table 1. Encoding sequence length of CSN1S1 gene and its access number in the database**

شماره دسترسی بانک اطلاعاتی Database Access Number	تعداد اگزون	طول توالی کد شونده Sequence Length	طول توالی ژن	گونه پستاندار Mammalian species
NM_181029	17	645 bp	1172 bp	Bos Taurus گاو
NM_001285695	16	642 bp	1103 bp	Capra hircus بز
NM_001009795	16	633 bp	1110 bp	Ovis aries گوسفند
NM_001303566	15	669 bp	1094 bp	Camelus dromedaries شتر
NM_001081883	16	639 bp	1139 bp	Equus caballus اسب
NM_001890	14	567 bp	981 bp	Homo sapiens انسان
FJ392261	17	633 bp	1165 bp	Bubalus bubalis (water buffalo) گاو میش
XM_023564129	14	668 bp	909 bp	Cavia porcellus خوک

جدول ۲: طول توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین

**Table 2. Sequence Length of the amino acid sequence of alpha protein s1 casein**

شماره دسترسی Access Number	طول توالی Sequence Length	گونه پستاندار Mammalian species
NP_851372	214 aa	Bos Taurus گاو
NP_001272624	213 aa	Capra hircus بز
NP_001009795	206 aa	Ovis aries گوسفند
NP_001290495	222 aa	Camelus dromedaries شتر
NP_001075352	212 aa	Equus caballus اسب
NP_001881	185 aa	Homo sapiens انسان
ACJ14317	206 aa	Bubalus bubalis گاو میش
XP_023419897	251 aa	Cavia porcellus خوک

استفاده شد و برای بررسی پایداری پروتئین و پپتیدها در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول) از نرم

افزارهای آنلاین

3Drefine

(<https://sysbio.mnet.missouri.edu/3Drefine/>) و

YASARA

(<https://yasara.org/minimizationserver.htm>)

استفاده گردید (۲۷ و ۱۳). سپس برای ارزیابی دقت

پیش‌بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی

فایل‌های بانک اطلاعات پروتئین حاصله در نرم افزار

آنلاین

RAMPAGE

<https://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampag>

پیش‌بینی و مقایسه ساختار سه بعدی: ساختار

سوم (سه بعدی) پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای

زیست فعال ایزراسیدین با استفاده از روش بندکشی

شده<sup>۱۰</sup> پیش‌بینی شد. براساس این روش پس از

استخراج توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1

کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین، ساختار

سه بعدی پروتئین‌ها و پپتیدهای مورد نظر برای هشت

گونه از پستانداران با نرم افزارهای بر خط I-

TASSER

(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I->

([galaxy.seoklab.org/](https://galaxy.seoklab.org/)) GalaxyWEB و TASSER)

## 10. Threading

بیشتری در اتصال و تخریب غشاء باکتری‌ها دارند بنابراین با توجه به نتایج جدول شماره ۳ می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً پروتئین و پپتیدهای ایزراسیدین در "خوک و گاو میش و شتر" نسبت به سایر گونه‌های پستانداران خاصیت آنتی‌باکتریال بیشتری خواهند داشت (۲۱).

نقطه ایزوالکتریک پپتید شیر بز و گوسفند تفاوت زیادی نسبت به سایر گونه‌های پستانداران مورد بررسی دارد که علت آن وجود اسید آمینه بازی لیزین در پپتید ایزراسیدین این دو گونه می‌باشد (۲۲). بنابراین می‌توان گفت که بالا بودن نقطه ایزوالکتریک باعث می‌شود تا در محیط‌های بازی، پپتید این دو گونه نسبت به سایر گونه‌های پستانداران دارای بیشترین فعالیت باشند که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

"براساس یافته‌های یانگ و همکاران (۲۰۰۱)، که به‌طور گسترده پپتیدهای ضد میکروبی (پپتیدهای کاتیونی) را مورد بررسی قرار داده اند می‌توان نتیجه گرفت که پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه‌های خاص همچون پرولین، گلايسين، هيستيدین و تریپتوفان دارای بیشترین توانایی تخریب غشاء سلول‌های باکتریایی را دارند. بنابراین براساس نتایج آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی جدول شماره ۴ مشخص شد که بیشترین خاصیت کاتیونی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین مربوط به "خوک و گاو میش" می‌باشد بنابراین خوک و گاو میش بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را نسبت به سایر پستانداران خواهند داشت (۲۸).

SAVES v5.0 و (e.php

(<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES>) مورد ارزیابی قرار گرفتند و در پایان بهترین ساختارهای پیش بینی شده انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (۲۶).

**بررسی برهمکنش پروتئین‌ها (داکینگ):** برای بررسی اثرات متقابل پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین با باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلای* و همچنین شبیه سازی این برهمکنش‌ها در درون سلول از نرم افزار آنالین ClusPro2.0 (<https://cluspro.bu.edu>) استفاده شد و با توجه به شرایط مختلف از جمله موقعیت مناسب و حداقل انرژی مورد نیاز برای اتصال پروتئین‌ها، نتایج برای انتخاب بهترین اتصال مورد بررسی قرار گرفتند (۶). همچنین فایل بانک اطلاعات پروتئین باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلای* (به ترتیب با شماره دسترسی 5JNM و 5I5H) برای بررسی اثرات متقابل آن با پروتئین و پپتیدهای آلفا s1 کازئین از سایت بانک اطلاعات پروتئین (<https://www.rcsb.org>) استخراج شد.

### نتایج و بحث

**آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی:** آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب‌دوستی و آب‌گریزی و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین در هشت گونه مختلف از پستانداران در جداول ۳ و ۴ آورده شده است.

"براساس پژوهش لست و همکاران (۲۰۱۳)، اسید آمینه‌های دارای خاصیت آبگریزی توانایی

جدول ۳: مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین در ۸ گونه از پستانداران

**Table 3. Comparison of the physico-chemical properties of alpha-s1 protein casein and Isracidin peptide in 8 species of mammals**

آنالیز analyze	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMEL US		گاو میش BUBAL US		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide
وزن (kDa)	1.1	21.6	0.6	24.5	0.9	24.1	0.9	23.3	1.1	25.8	0.6	23.4	0.8	25.3	1	28.9
نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	5.5	5.5	5.2	5.18	9.9	5.28	9.9	5.67	5.5	5.23	5.7	5.9	5.6	6.24	3.4	7.8
نیمه عمر half time	2.8	30	5.5	30	1.3	30	1.3	30	2.8	30	5.5	30	0.8	30	2.8	30
وضعیت آبدوستی Hydrophilic	5	66	2	55	3	63	3	56	5	59	2	54	3	61	4	70
وضعیت آبگریزی Hydrophobic	3	75	4	101	3	100	3	99	4	97	4	304	3	84	3	120

جدول ۴: مقایسه وضعیت اسید آمینه در ۸ گونه از پستانداران.

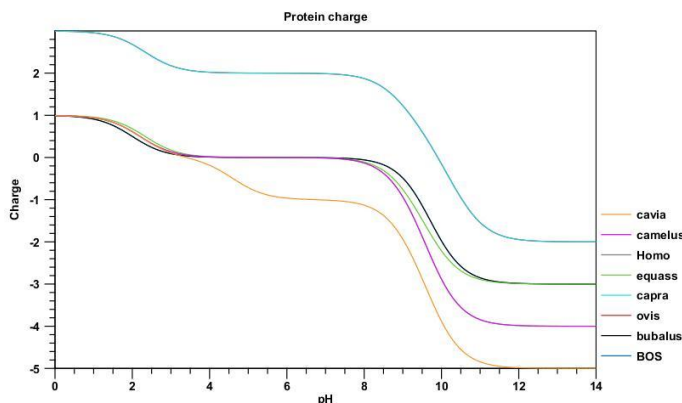
**Table 4. Comparison of amino acid status in 8 species of mammals**

اسید آمینه Amino Asid	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMELUS		گاو میش BUBALUS		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide
آلانین Alanine	-	12	1	12	-	15	-	14	-	9	1	12	1	13	-	19
سیتونین Cysteine	-	4	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	6
آسپارتیک اسید Aspartic Aasid	-	3	-	7	-	7	-	7	-	12	-	7	-	7	-	6
گلوتامیک اسید Glutamic Aasid	-	20	-	25	-	20	-	19	-	24	-	20	-	25	1	18
فنیل آلانین Phenilalanine	-	4	1	8	-	7	-	6	-	5	1	8	1	6	-	10
گلايسین Glycine	-	1	-	9	-	9	-	9	-	6	-	11	-	0	1	6
هیستیدین Histidine	-	3	-	5	-	4	-	4	-	5	-	4	-	7	-	13
ایزولوسین Isolecsine	1	8	-	12	-	9	-	12	-	12	-	12	-	13	-	8
لیزین Lysine	-	6	-	15	2	13	2	15	-	14	-	12	-	15	-	9
لوسین Lecsine	-	17	1	22	1	22	1	22	-	23	1	22	1	22	-	27
متیونین Methionine	1	8	-	6	-	6	-	6	1	5	-	7	-	5	-	9
آسپارژین Asparagine	-	15	-	8	1	12	1	10	-	7	-	7	-	8	-	7
پروлін Proline	1	14	1	17	1	19	1	17	2	19	1	18	-	14	1	23

گلو تامین Glutamine	2	17	-	14	1	14	1	14	2	15	-	17	1	22	1	26
آرژنین Arginine	-	12	-	6	-	6	-	6	-	11	-	5	-	13	-	15
سرین Serine	-	16	-	16	-	18	-	18	-	16	-	14	-	14	-	16
ترئونین Teronine	-	5	-	6	-	7	-	4	-	9	-	5	-	6	-	8
والین Valine	-	9	-	13	1	11	1	11	1	1	-	1	-	1	1	16
تریپتوفان Tryptophan	-	2	-	2	-	2	-	2	-	3	-	2	-	2	-	2
تیروزین Tyrosine	3	9	2	10	1	11	1	9	3	11	2	10	2	10	3	7

مربوط به پپتید گوسفند و بز می‌باشد. بنابراین با توجه به تحقیقات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین خاصیت ضدباکتریایی پپتید ایزراسیدین مربوط به "گوسفند و بز" می‌باشد (۵).

"براساس نتایج تحقیقات گسترده براگن (۲۰۰۵)، در مورد نابودی سلول‌های باکتریایی با تخریب غشای سلولی یا غشای میتوکندری توسط پپتیدهای ضد باکتریایی از طریق اتصال این ترکیبات به غشا آنیونیک باکتری، طبق شکل شماره ۱ مثبت ترین بار الکتریکی



شکل ۱: بار الکتریکی و PH پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین در ۸ گونه پستانداران

Figure 1. Charge and pH of alpha-protein s1 casein and Isracidin peptide in 8 species of mammals

پیش‌بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیست فعال در ۸ گونه مختلف از پستانداران: از طریق بررسی منابع موجود، توالی پپتید ایزراسیدین برای گاو استخراج و براساس موقعیت قرارگیری آن‌ها برای سایر گونه‌های پستانداران توالی پپتیدی پیش‌بینی شد و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی توالی‌های مورد نظر پیش‌بینی گردید و از میان ساختارهای مورد نظر بهترین پیش‌بینی براساس حداقل انرژی و شرایط دینامیکی انتخاب گردید و

مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین: براساس آنالیز بیوانفورماتیکی مشخص شد که بیشترین درصد تشابه توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین در پستانداران مختلف مربوط به گاو، گاو میش، گوسفند و بز و کمترین درصد تشابه مربوط به انسان و خوک است. مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین آلفا s1 کازئین برای هشت گونه مختلف از پستانداران در جدول ۵ نشان داده شده است.

بصورت فایل PDB برای آنالیزهای پپتیدی ذخیره شد. پستانداران در جدول شماره ۶ نشان داده شده است. توالی‌های پپتیدی ایزراسیدین در گونه‌های مختلف

جدول ۵- اختلاف (بالای قطر) و درصد تشابه (پایین قطر) اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین در ۸ گونه مختلف از پستانداران

**Table 6. Difference (Upper comparison) and percent identity (Lower comparison) of amino acid content in Protein Alpha-s1 Casein in 8 Mammalian Species**

8	7	6	5	4	3	2	1			
Cavia porcellus خوک	Homo sapiens انسان	Equus caballus اسب	Camelus dromedaries شتر	Ovis aries گوسفند	Capra hircus بز	Bubalus bubalis گاو میش	Bos Taurus گاو			
398	347	254	256	72	40	55		1	Bos Taurus	گاو
410	356	272	280	86	78		91.63	2	Bubalus bubalis	گاو میش
403	341	259	253	49		88.13	93.80	3	Capra hircus	بز
384	331	288	285		92.54	89.91	89.04	4	Ovis aries	گوسفند
407	319	218		62.09	63.33	59.77	62.90	5	Camelus dromedaries	شتر
385	296		67.56	57.71	61.34	59.70	62.09	6	Equus caballus	اسب
412		54.95	53.43	50.52	49.93	47.95	49.12	7	Bos Taurus	گاو
	42.22	46.97	45.37	47.18	45.69	45.41	46.36	8	Bubalus bubalis	گاو میش

جدول ۶- پپتیدهای آنتی باکتریال در ساختار ثانویه کازئین در ۸ گونه از پستانداران

**Table 6. Antibacterial peptides in the secondary structure of casein in 8 species of mammals**

منابع References	قطعه اسید آمینه Amino acid segment	توالی پپتیدی Peptide sequence	نام پپتید peptide name	گونه Species
(21)	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF	1-23	Isracidin	Bos Taurus گاو
Predicted in this study	AMPKFPFRHTELFQVSTVPCPPD VPCGSDCD	1-31	Isracidin	Bubalus bubalis گاو میش
Predicted in this study	RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF	1-23	Isracidin	Capra hircus بز
Predicted in this study	RPKQPIKHQGLPQGVLNENLLRF	1-23	Isracidin	Ovis aries گوسفند
Predicted in this study	RPKHPINHQGLSPEVLNENLLRF	1-23	Isracidin	Camelus dromedaries شتر
Predicted in this study	RPKLPHRQPEIIQNEQDSREKVL	1-23	Isracidin	Equus caballus اسب
Predicted in this study	RPKYPLRYPEVVFQNEPDSIEVLN KRKILE	1-30	Isracidin	Bos Taurus گاو
Predicted in this study	RPKLPLRYPERLQNPSESSE	1-20	Isracidin	Cavia porcellus خوک

بر اساس مقایسه هم ردیف پپتید ایزراسیدین، اسب و کمترین شباهت مربوط به گاو و گاو میش می-  
بیشترین شباهت پپتید ایزراسیدین مربوط به انسان و  
باشد که در شکل ۲ نشان داده شده است.



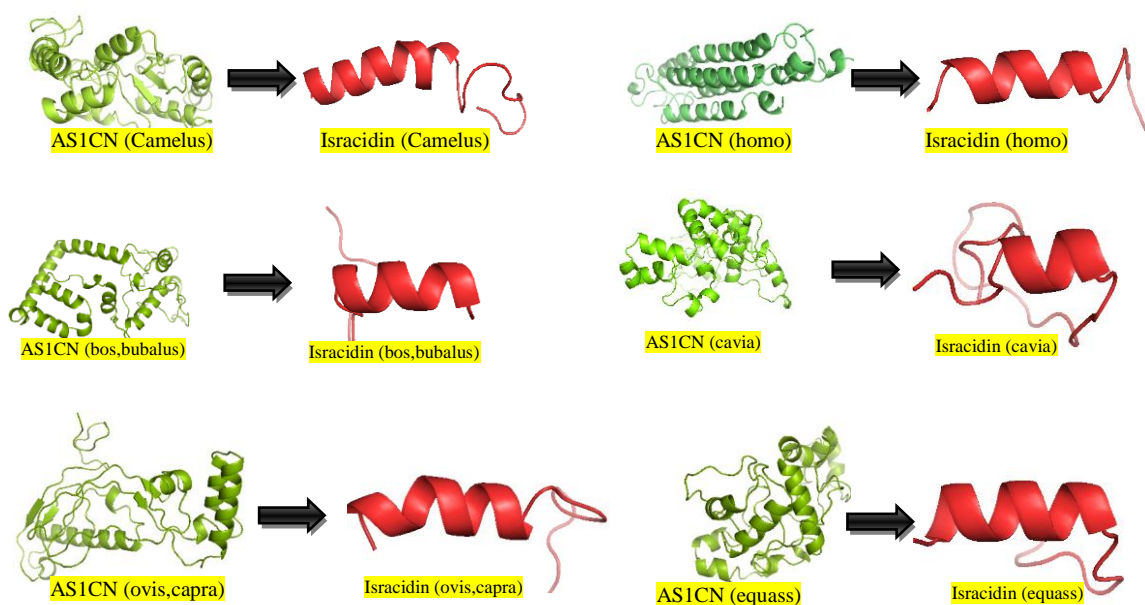
Bos taurus	RPKHP I KHQ	GL - - - - - P	QEVLENENLLR	F
ovis	RPKHP I KHQ	GL - - - - - S	PEVLNENLLR	F
bobalus	RPKQP I KHQ	GL - - - - - P	QGVLNENLLR	F
capra	RPKHP I NHQ	GL - - - - - S	PEVPNENLLR	F
homo	RPKLPLRYP	ERLQNPSESS	E - - - - -	-
camelus	RPKYPLRYP	EVFQNEPDSI	EEVLNKRKIL	E
equass	RPKLPHRQP	E I IQNEQDSR	EKVL - - - - -	-
cavia	- PKFPFRHT	ELFQVSTVPC	PPDVPCGSDC	D

شکل ۲- مقایسه هم ردیف پپتید ایزراسیدین در ۸ گونه از پستانداران

Figure 2. Comparison of the Isracidin Peptide in In 8 different mammalian species

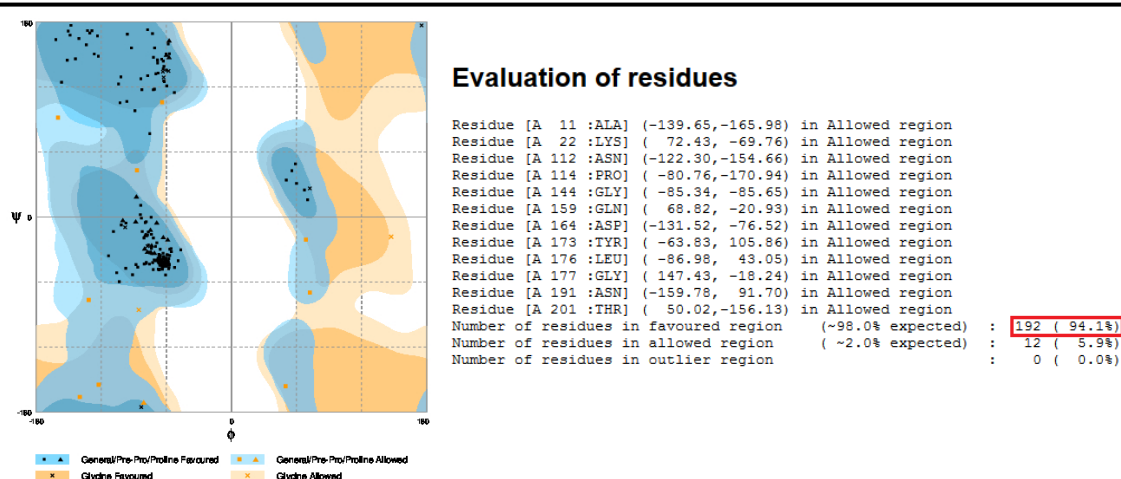
را بر کند. از طرفی کاهش طول پپتید باعث کاهش تمایل آن‌ها به ایجاد ساختار نوع دوم آلفاهلیکس می‌شود که تحقیقات نشان داده‌اند نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی پپتیدها ایفا می‌کند (۵). بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که آرایش فضائی (ساختار سه بعدی) پروتئین و پپتیدهای اثر زیادی بر خاصیت آنتی باکتریال آن‌ها خواهد داشت به طوری که ساختار صحیح از پروتئین یا پپتید باعث می‌شود تا برهمکنش مناسبی با ساختار غشاء پروتئین سطحی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلای ایجاد شود و در نتیجه آن مهار فعالیت باکتریایی را به دنبال خواهد داشت.

پیش‌بینی و مقایسه ساختار سه بعدی: با استفاده نرم افزارهای آنالین I-TASSER و GalaxyWEB بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین استخراج شده برای تمامی گونه‌های مختلف از پستانداران ساختار سه بعدی پیش‌بینی گردید. سپس برای ارزیابی دقت پیش‌بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های بانک اطلاعات پروتئین حاصله از نرم‌افزار آنالین (RAMPAGE) استفاده شد که در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. برای بروز فعالیت ضد میکروبی لازم است که پپتید ضخامت غشای سلولی که حدوداً ۴۰ Å می‌باشد



شکل ۳- ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین

Figure 3. The predicted three-dimensional structure for alpha-protein s1 casein and Isracidin peptide



شکل ۴- بررسی نتایج ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدها پیش بینی شده در پلات رام-چاندرا  
**Figure 4. The results of three-dimensional structure of protein and peptides predicted in the Rama-Chandran Plate**

مانند مهار سنتز پروتئین یا دزوکسی نوکلئیک اسید<sup>۱۱</sup> و ایجاد اختلال در دیواره سلولی با تعاملات الکترواستاتیک و اتصال به غشا آنیونیک باکتری سبب مرگ باکتری می شود و همچنین با اتصال به گیرنده های زنگوله ای سلول میزبان و تحریک آن باعث پاسخ ایمنی نسبت به این باکتری ها خواهد شد و خاصیت آنتی باکتریایی این نوع پپتیدها را افزایش خواهد داد. (۵). بنابراین با توجه به نتایج برهمکنش پروتئین- پروتئین حاصل از بررسی موقعیت و انرژی اتصال پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین به پروتئین سطحی غشاء باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس /اورئوس، می توان گفت که بهترین موقعیت اتصال با بیشترین انرژی مربوط به پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین شیر "گوسفند و خوک" می باشد. لذا براساس نتایج بیوانفورماتیکی می توان پیش بینی کرد شیر گوسفند و خوک نسبت به سایر پستانداران عملکرد بهتری در اتصال و تخریب پروتئین سطحی غشاء باکتری های /استافیلوکوکوس اورئوس و نابودی سلول این باکتری خواهد داشت و در نتیجه آن در کاهش بیماری ورم پستان بسیار موثر خواهد بود.

بررسی برهمکنش (داکینگ) پروتئین ها و پپتیدهای شناسائی شده با باکتری ها: بررسی عملکرد پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای ایزراسیدین شناسائی شده برای هشت گونه مختلف از پستانداران در مقابله با باکتری های /استافیلوکوکوس اورئوس و /شرشیا کلای با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مختص داکینگ پروتئین- پروتئین نظیر نرم افزار آنالین ClusPro2.0 صورت گرفت. براین اساس میزان انرژی و موقعیت اتصال پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای ایزراسیدین با پروتئین سطحی غشاء باکتری های /استافیلوکوکوس اورئوس و /شرشیا کلای مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج براساس فرمول زیر در جدول و شکل زیر نشان داده شده است (۱۷ و ۱۸).

$$E = 0.40E_{rep} + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$$

عملکرد ضدباکتریایی پپتیدهای ضد میکروبی عمدتاً از طریق تعامل با غشاهای باکتریایی حاصل می شود. از لحاظ دینامیک مولکولی هرچه موقعیت اتصال پپتیدهای ضدباکتریایی با سطح غشاء باکتری مناسب تر و اتصال با انرژی بیشتری صورت گرفته باشد از طریق هدف قرار دادن فرآیندهای کلیدی داخل سلولی

حجت‌اله یامی و همکاران

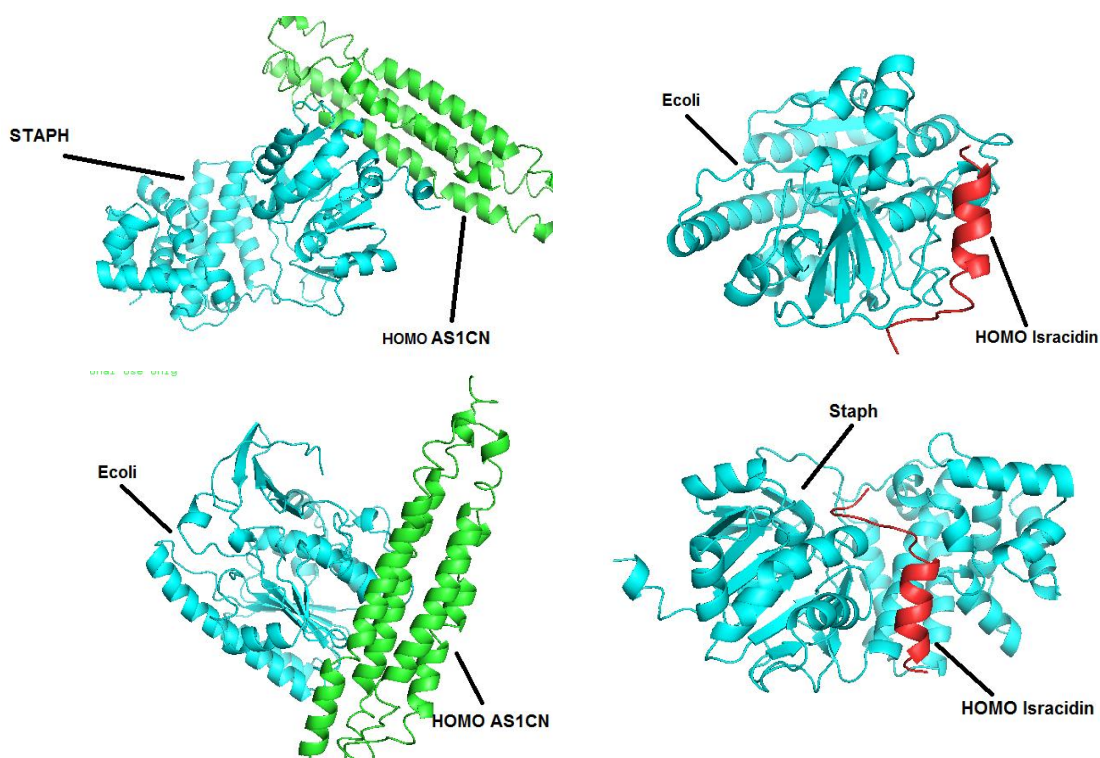
انسان و گاومیش نسبت به سایر پستانداران بیشترین عملکرد درمقابله و تخریب سلول غشاء باکتری /کلی را داشته و در نتیجه آن در کاهش بیماری ورم پستان حائز اهمیت خواهد بود اما اثبات این موضوع نیاز به- انجام آزمایشات تکمیلی دارد.

همچنین بررسی‌های برهمکنش پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین بر پروتئین سطحی باکتری /کلی نشان می‌دهد که بیشترین انرژی اتصال مربوط به شیر "انسان و گاومیش" می‌باشد. پس براساس نتایج بیوانفورماتیکی می‌توان پیش‌بینی کرد که شیر

جدول ۷: مقایسه انرژی اتصال برای برهمکنش‌های پروتئین و پپتیدهای در ۸ گونه مختلف پستانداران

Table 8. Comparison of binding energy for protein and peptide interactions in 8 different mammalian species

-ΔG (kcal/mol)				گونه پستاندار
Staph		Ecoli		
AS1CN	Isracidin	AS1CN	Isracidin	
-850.4	-555.2	-922.9	-788.6	(homo) انسان
-774.6	-646.4	-952.2	-665.3	(bos) گاو
-904	-614.4	-909.7	-711.8	(ovis) گوسفند
-778.2	-646.4	-1023.3	-665.3	(bubalus) گاو میش
-827.3	-614.4	-981.4	-711.8	(capra) بز
-825.9	-532	-973.2	-627.8	(equass) اسب
-808.6	-694.4	-961.8	-722.8	(Camelus) شتر
-859	-733	-986.7	-749.2	(cavia) خوک



شکل ۵- موقعیت فضایی برهمکنش پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید ایزراسیدین انسان با باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلای

Figure 6. Situation of the interaction between proteins αs1 and casein and human Isracidin peptide with Staphylococcus aureus and Escherichia coli

4. Bhattacharya, D., Nowotny, J., Cao, R. and Cheng, J. 2016. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids. Res.*
5. Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–250.
6. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda S. and Camacho, C.J. 2004. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *J. Bioinformatics.* 20: 45-50.
7. Cordopatis, P. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. *Curr. J. Medi. Chemist.* 4: 403-429.
8. Guggenheim, B., Schmid, R., Aeschlimann, J., Berrocal, R. and Neeser, J.R. 1999. Powdered Milk Micellar Casein Prevents Oral Colonization by *Streptococcus sobrinus* and Dental Caries in Rats: A Basis for the Caries-Protective Effect of Dairy Products. *Caries. Res.* 33(6): 446-454.
9. Guler, L., Ok, U., Gunduz, K., Gulcu, Y. and Hadimli, H.H. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J. Dairy. Sci.* 88: 3149-3154.
10. Hata, I., Higashiyama, S. and Otani, H. 1998. Identification of a phosphopeptide in bovine alpha s1-casein digests as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. *J. Dairy. Sci.* 65(04): 569-578.
11. Hayes, M., Ross, R., Fitzgerald, G., Hill, C. and Stanton, C. 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl. Enviro. microbiol.* 72(3): 2260-2264.
12. Kampa, M., Bakogeorgou, E., Hatzoglou, A., Damianaki, A., Martin, P.M. and Castanas, E. 1997. Opioid

### نتیجه گیری

با توجه به اثرات مخرب بیماری ورم پستان بر سلامت انسان از طریق امکان انتقال سویه های باکتریایی مقاوم شده به آنتی بیوتیک از دام به انسان؛ جایگزین کردن آنتی بیوتیک ها با ترکیباتی که اثرات جانبی ندارند حائز اهمیت است. پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال ایزراسیدین به دلیل خواص بیولوژیکی فراوان و از جمله خاصیت ضد باکتریایی آن در سلامتی بدن از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در بررسی بیوانفورماتیکی این پروتئین و پپتیدها در موجودات مختلف مشخص شد که شیر گوسفند و خوک دارای بالاترین عملکرد در نابودی باکتری *استافیلوکوکوس*، شیر انسان و گاو میش نیز بهترین عملکرد در مقابله با باکتری *اشرشیا کلای* و جلوگیری از بیماری ورم پستان را دارا هستند. بنابراین به نظر می رسد که می توان از پپتیدهای ایزراسیدین به عنوان عامل طبیعی و مواد جایگزین آنتی بیوتیک برای کاهش اثرات مخرب بیماری ورم پستان بر سلامت انسان از طریق امکان انتقال سویه های باکتریایی مقاوم شده به آنتی بیوتیک از دام به انسان و همچنین افزایش کیفیت شیر مصرفی استفاده کرد اما اثبات این موضوع نیاز به انجام آزمایشات در شرایط آزمایشگاهی خواهد داشت.

### منابع

1. Aimutis, W.R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nut.* 4: 989-995.
2. ARoy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *J. Nature. Protocols.* 5: 725-738.
3. Barkema, H.W., Green, M.J., Bradley, A.J. and Zadoks, R.N. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy. Sci.* 92: 4717-4729.

- peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *J. Dairy. Sci.* 77(5): 1167-75.
21. Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M., Xavier, E. and Malcata, F. 2007. Bovine whey proteins- Overview on their main biological properties. *Food. Res.* 40(10): 1197-211.
  22. McCann, K., Shiell, B., Michalski, W., Lee, A., Wan, J. and Roginski, H. 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha$ S1-casein. *J. Dairy. Sci.* 16(4): 316-23.
  23. Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Kim, J.M., Joo, Y.S. and Jung, S.C. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J. Dairy. Sci.*, 92: 2020-2026.
  24. Shin, W.H., Lee, G.R., Heo, L., Lee, H. and Seok, C. 2014. Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY protein modeling programs. *J. Bio. Design.* 2 (1): 1-11.
  25. Van Hooijdonk, A., Kussendrager, K. and Steijns, J. 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.* 84: 127-34.
  26. Yan, C., Xu, X. and Zou, X. 2017. The Usage of ACCLUSTER for Peptide Binding Site Prediction. *Modeling Peptide-Protein Interactions.* Humana Press, New York. 3-9.
  27. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods.* 12: 7-8.
  28. Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. and Huang, H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model A case study on melittin pores. *J. Biophys.* 81: 1475-1485.
  29. Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9: 40.
  - alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J. Pharmacol.* 335(2-3): 255-265.
  13. Kampa, M., Loukas, S., Hatzoglou, A., Martin, P., Martin, P.M. and Castanas, E. 1996. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human  $\alpha$ S1 casein ( $\alpha$ S1-casomorphin, and  $\alpha$ S1-casomorphin amide). *J. Biochem.* 319: 903-908.
  14. Kim, Y.K., Yoon, S., Yu, D.Y., Lönnerdal, B. and Chung, B.H. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\alpha$ s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy. Sci.* 66: 431-439.
  15. Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S., Xia, B., Hall, D.R. and Vajda, S. 2013. How good is automated protein docking. *Proteins, Structure, Function, and Bioinformatics.* 81: 2159-2166.
  16. Kozakov, D., Hall, D.R., Xia, B., Porter, K.A., Padhony, D., Yueh, C., Beglov, D. and Vajda, S. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Natu Prot. Feb.* 12(2): 255-278.
  17. Lahov, E. and Regelson, W. 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *J. Food Chem. Toxicol.* 34: 131-145.
  18. Last, N.B., Schlamadinger, D.E. and Miranker, A.D. 2013. A common landscape for membrane- active peptides. *J. Prot. Sci.* 22: 870-882.
  19. Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F., Peng, C., Wu, G. and Zhao, J. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *J. Plan. Physiol.* 122: 1015-1024.
  20. MacDonald, R.S., Thornton, W.H. and Marshall, R.T. 1994. A cell culture model to identify biologically active





## Antibacterial effect of protein and bioactive peptides of Alpha S1-Casein, on bacterial mastitis in different species of mammals with docking method

H.A. Yami<sup>1</sup>, \*M. Tahmoorespur<sup>2</sup>, M. Azghandi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. student and <sup>2</sup>Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 10/09/2018; Accepted: 26/01/2019

### Abstract

**Background and Objectives:** Generally, the causes of mastitis are classified in two types: infectious (staphylococcus aureus) and environmental (Escherichia coli). The common method to treat this disease is using antibiotics which cause problems with human health. Bioactive peptides are those created in the laboratory with in partial protein digestion of living organisms. Casein contains antibacterial peptides called Isracidin, which destroys cell membrane or mitochondrial membrane and cause destruction of bacterial cells. The purpose of this study was: identifying the antibacterial protein and bioactive peptides of Alpha S1 protein in the casein of eight mammalian species, comparing antibacterial feature of peptides in these eight mammalian species with two major bacteria that cause staphylococcus aureus and Escherichia coli.

**Materials and methods:** First, the genomic and protein information of eight different mammalian species (cattle, sheep, camels, horses, human, ewes and pigs), was collected from the National Center for Bioinformatics Information (NCBI), and then, three dimensional structure of Alpha S1 and the bioactive peptide in casein was predicted by the online software ACCLUSTER SERVIS, I-TASSER and Calaxy WEB. In order to evaluate protein and peptide stability under dynamic conditions (intracellular conditions), 3Drefine and YASARA software were used. Finally, interaction (docking) of alpha s1 casein and bioactive peptides of Isracidin with mastitis causing bacteria inside the cell was simulated, using Cluspro 2.0 software online.

**Results:** Bioinformatics analysis on the molecular interaction of protein and its bioactive peptides in studied mammalian species with surface proteins in the membrane of two major bacterial mastitis shows that "sheep and pig" milk has the highest ability in destroying staphylococcus bacteria, "human and ewes" also have the best ability against Escherichia coli and prevent mastitis (mastitis).

**Conclusion:** Therefore, it seems that Isracidin peptides can be used as natural factor and substitution of antibiotic for reducing destructive effects of mastitis on human health. This is done through transferring livestock resistant bacterial strains against antibiotics to human, and also, increasing the quality of milk (reducing the number of somatic cells in milk, increasing milk production and less damage to mammary tissue).

**Keywords:** Mastitis, Alpha s1 casein protein, bioactive peptides, Molecular interactions.

---

\*Corresponding author; m\_tahmoorespur@yahoo.com