

Bioinformatics Study of the Interaction between Melittin Protein and P24 Protein in HIV and SIV Viruses

Zahra Hasanshahi¹,
Behzad Dehghani²,
Tayebeh Hashempour³,
Javad Moayed¹

¹ MSc in Microbiology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

² BSc in Biology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³ PhD in Virology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received August 25, 2019 ; Accepted September 20, 2022)

Abstract

Background and purpose: P24 is one of the important components of retroviruses capsid. Several studies have shown the inhibitory effect of melittin protein on the function of AIDS virus. The aim of this study was to evaluate the effect of this protein on P24 in SIV and HIV viruses using bioinformatics software.

Materials and methods: P24 protein sequences of SIV and HIV were obtained from a gene bank and their features were analyzed using different software programs. Also, structural similarities of P24 protein between SIV and HIV viruses were examined. Docking analysis was used to examine the interactions between melittin and P24 proteins. The stability of docking results were confirmed by molecular dynamics simulation.

Results: Findings showed numerous phosphorylation, glycosylation sites, and di-sulfide bonds in P24 protein. Docking results indicated a probable interaction between P24 protein of both viruses and melittin. The results showed similarity of the third structure of P24 protein between the two viruses. Analysis of molecular dynamics showed molecular stability of the interactions between P24 and melittin proteins.

Conclusion: High energy values of the interaction between melittin and P24 indicated high binding potential of the two proteins, which can determine the inhibitory effect of melittin on the function of HIV capsid. Analysis of the third structure of P24 protein in both viruses showed that they are very similar despite the high difference in protein sequences from the point of view of folding and 3D structure. Application of melittin to control SIV infections in primates can be used as a model for inhibiting HIV in humans.

Keywords: HIV, SIV, melittin, bioinformatics

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 153-166 (Persian).

Corresponding Author: Tayebeh Hashempour - Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. (E-mail: thashem@sums.ac.ir)

بررسی بیوانفورماتیکی برهم کنش پروتئین ملیتین با پروتئین P24 ویروس‌های HIV و SIV

زهرا حسن شاهی¹

بهزاد دهقانی²

طیبه هاشم پور³

جواد مویدی¹

چکیده

سابقه و هدف: P24 یکی از اجزای مهم کپسید رتروویروس‌ها می‌باشد. مطالعات متعددی اثر مهارتی پروتئین ملیتین را بر روی عملکرد ویروس ایدز نشان داده‌اند. هدف این مطالعه بررسی تأثیر این پروتئین بر روی پروتئین P24 در دو ویروس SIV (ویروس نقص ایمنی میمونی) و HIV (ویروس نقص ایمنی انسانی) با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی بود.

مواد و روش‌ها: توالی‌های پروتئین P24 دو ویروس SIV و HIV از بانک ژنی دریافت شد و سپس توسط نرم‌افزارهای متعددی ویژگی‌های آن بررسی شد. هم‌چنین تشابهات ساختاری پروتئین P24 در SIV و HIV مورد مطالعه قرار گرفت و از آنالیز داکینگ برای بررسی برهم‌کنش پروتئین‌های ملیتین و P24 استفاده شد و پایداری نتایج داکینگ به روش دینامیک مولکولی تأیید شدند.

یافته‌ها: وجود جایگاه‌های متعدد فسفوریلاسیون، گلیکوزیلاسیون و پیوند دی سولفید در پروتئین P24 مشاهده شد. نتایج داکینگ نشان‌دهنده امکان اتصال بالایی بین پروتئین P24 هر دو ویروس و ملیتین بود. هم‌چنین تشابه بالایی ساختار سوم پروتئین P24 در دو ویروس مشخص شد. بررسی دینامیک مولکولی نشان‌دهنده پایداری مولکولی برهم‌کنش بین دو پروتئین ملیتین و P24 بود.

استنتاج: انرژی بالای اتصال بین ملیتین و پروتئین P24 نشان‌دهنده امکان زیاد اتصال این دو پروتئین است که می‌تواند تعیین‌کننده اثر مهارتی پروتئین ملیتین بر عملکرد ساختار کپسید هر دو ویروس باشد. بررسی تشابه ساختار سوم پروتئین P24 در هر دو ویروس نیز نشان داد علی‌رغم وجود تفاوت بالا در توالی پروتئینی، آن‌ها از لحاظ فولدینگ و ساختار فضایی بسیار مشابه هستند. استفاده از ملیتین در مهار عفونت‌های SIV در میمون‌ها می‌تواند به عنوان مدلی برای مهار ویروس HIV در انسان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: HIV، SIV، P24، ملیتین، بیوانفورماتیک

مقدمه

ویروس نقص ایمنی میمونی
عفونی از خانواده رتروویروس‌ها و از سرده ویروس‌های آهسته گستر (لنتی ویروس) است (1).

E-mail: thashem@sums.ac.ir

مؤلف مسئول: طیبه هاشم پور - شیراز: خیابان لاوان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، پژوهشکده سلامت

1. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

2. لیسانس زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

3. دکترای ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: 1398/6/3 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/9/3 تاریخ تصویب: 1401/6/29

به طوری که دوره انکوباسیون طولانی ویروس قبل از علائم بیماری نشان دهنده این موضوع است. این ویروس بسیار شبیه به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV: Human immunodeficiency virus) است. این کشف نشان داد که SIV از گوریل ها به انسان منتقل شده است (2,3). مطالعات مربوط به مبانی تکاملی نشان می دهد که SIV شکل پیش ماده ویروس HIV در انسان است که این ویروس به طریقی از پرمات ها به انسان منتقل شده است و از طریق جهش تصادفی به HIV تبدیل شد (4,5). SIV مانند ویروس HIV از طریق تماس با مایعات آلوده بدن مانند خون منتقل می شود (6). این ویروس در بیش تر گونه ها بیماری شدیدی را به وجود نمی آورد، با این حال در شامپانزه ها عفونت ویروس SIV می تواند یک بیماری شبیه به ایدز در انسان ایجاد کند. مطالعات نشان داده است که ویروس SIV همانند ویروس HIV سلول های T helper را که گلبول های سفید خون هستند و نقش مهمی در تنظیم انواع عملکرد ایمنی دارند را آلوده می کند (7). سلول های آلوده به SIV معمولاً طی یک روز از شروع عفونت باعث ایجاد آپوپتوز (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) سلولی می شوند. در نهایت به علت مرگ سریع سلول ها، سیستم ایمنی بدن توانایی جایگزین کردن دوباره آن ها را ندارد و بنابراین عملکرد سیستم ایمنی به تدریج ضعیف تر می شود و موجب سندرم نقص ایمنی شده و باعث می شود حیوان سریع تر احساس خستگی کند و نسبت به عفونت ها آسیب پذیر تر شود. HIV عامل بیماری ایدز در سال های اخیر یکی از مهم ترین نگرانی های سیستم بهداشت عمومی در بسیاری از کشورهای جهان بوده است و تلاش های بسیاری برای یافتن راه درمانی یا پیشگیری از این بیماری انجام شده که تاکنون راه درمانی یا واکسن مؤثری برای آن یافت نشده است (8-11). مطالعات بسیار زیادی بر روی تأثیر پروتئین ملتین بر ویروس HIV صورت گرفته است. در سال 2013 گزارشی مبنی بر اثرات ملتین روی ویروس ایدز منتشر شد. ملتین فعال ترین جزء زهر زنبور بوده و شامل 52 درصد

از پپتیدهای موجود در زهر است، که اولین بار از زهر *Apis mellifera* جداسازی شد که شدیداً قلیایی و دارای 26 آمینواسید است (12-14). قسمت انتهایی نیتروژن دار آن آب گریز و قسمت کرین در انتهای آن آب دوست است (15). این پروتئین پیوند دی سولفید ندارد و به عنوان یک فاکتور لیز کننده غشای سلولی عمل می کند و نفوذپذیری غشای سلول ها را نسبت به یون ها افزایش می دهد و یک عامل ضد التهابی قوی بوده و سبب القای کورتیزول در بدن می شود. از دیگر اثرات و عملکردهای این پروتئین تجزیه سلول های خونی، خواص ضد میکروبی و ضد توموری است که با تخریب دیواره سلولی سبب نابودی سلول های توموری می شود. یک نانوذره حامل ملتین با از بین بردن پوشش دولا به لیپیدی احاطه کننده HIV سبب نابودی ویروس می شود. مطالعات نشان می دهد که ملتین علاوه بر تأثیر روی پوشش ویروس، تأثیر بسزایی نیز روی پروتئین GAG دارد و از رونویسی آن جلوگیری می کند. همچنین فعالیت LTR ویروس را کاهش می دهد و به صورت کلی باعث کاهش تکثیر و بیان ویروس می شود.

مطالعات متعددی توسط دهقانی و همکاران (16)، Fujii و همکاران (17)، Apellániz و همکاران (18)، معماریانی و همکاران (19) در سالیان اخیر مویند تاثیر مهارتی پروتئین ملتین بر envelope ویروس HIV بوده اند. به علاوه Hood و همکاران از نانوذرات برای انتقال این پروتئین استفاده نموده و توانایی این پروتئین برای ایجاد منافذی در envelope ویروس HIV و در نهایت تخریب آن را تایید کردند (20). هم چنین Wachinger در سال 1998 نشان داد ملتین با اثر مستقیم سرکوب کننده بر فعالیت LTR HIV مانع بیان ژن HIV می شود (21). در سالیان اخیر استفاده از روش های بیوانفورماتیکی برای بررسی پدیده های زیستی نقش تعیین کنندگی در تحقیقات ویروس شناسی ایفا کرده است. در این میان نرم افزارهای متعددی برای تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی، تعیین پیرایش های پساترجمه ای، تعیین ساختارهای دوم و سوم

پروتئین‌های با دقت قابل قبول ارائه شده‌اند. هم‌چنین نرم‌افزارهای متعددی مانند Hex نیز در سال‌های اخیر برای بررسی برهم‌کنش‌های لیگاند-پروتئین و پروتئین-پروتئین معرفی شده‌اند، که برای درک بهتر برهم‌کنش‌های ممکن بین ماکرومولکول‌ها به کمک محققین آمده‌اند. در مطالعات متعددی از این فرایندها برای بررسی پروتئین‌های ویروسی و هم‌چنین برهم‌کنش پروتئین‌های ویروسی یا داروهای مهارکننده و هم‌مهارکننده‌های طبیعی استفاده شده است که درک بهتری از توانایی این مهارکننده‌ها در اختیار محققین قرار داده‌اند. با توجه به تشابهات ژنوم و پروتئین‌های دو ویروس HIV و SIV انتظار می‌رود تشابهات بسیاری نیز در ساختار کپسید این دو ویروس وجود داشته باشد. پروتئین P24 جزء اصلی تشکیل‌دهنده کپسید این ویروس است. با توجه به اطلاعات موجود درمورد تشابهات ژنومی این دو ویروس هدف این مطالعه بررسی تغییرات فیزیکی و شیمیایی و هم‌چنین تغییرات آمینواسیدهای ملیتین و P24 HIV بود و همچنین تجزیه و تحلیل ساختارهای سوم این پروتئین‌ها و بررسی برهم‌کنش پروتئین ملیتین با P24 HIV و P24 SIV انجام شد که نتایج آن می‌تواند راه را برای مطالعات بیش‌تر بر روی عملکرد پروتئین ملیتین در جهت مهار ویروس SIV در پریما‌تها و در نهایت ویروس HIV در انسان هموار کند.

مواد و روش‌ها

تجزیه و تحلیل توالی

سه توالی ملیتین از سه گونه زنبورعسل و سه توالی P24 HIV از سه subtype متفاوت و هم‌چنین چهارده سکانس SIV از بانک ژنی NCBI تهیه شد و مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره 1).

سه گونه زنبورعسل *Apis cerana* (سرنا)، *Apis florea* (فلورئا) و *Apis mellifera* (ملیفرا) از مهم‌ترین گونه‌های زنبورعسل موجود در جهان هستند. *Apis cerana* از گونه‌های اصلی موجود در این ایران و

هم‌چنین جنوب شرق آسیا است. *Apis florea* زنبور بومی اروپا و آفریقا است و *Apis mellifera* نیز بومی در خاورمیانه و قسمت‌هایی از جنوب شرق آسیا است. با انتخاب سه توالی از این سه گونه زنبور، تغییرات در سطح پروتئین ملیتین مورد بررسی قرار گرفت و هم‌چنین تاثیر این تغییرات روی برهم‌کنش این پروتئین با پروتئین P24 بررسی شد.

جدول شماره 1: شماره‌های دسترسی ثبت شده در بانک ژنی توالی‌های ملیتین، P24 SIV و P24 HIV که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند

SIV	Melittin	HIV
KP162156	AF487907(<i>Apis cerana</i>)	HIV AD35 (AB703607)
KP162163	XP_003689966(<i>Apis florea</i>)	HIV A1(U51190)
KP162160	NM_001011607(<i>Apis mellifera</i>)	HIV B(M17451)
KP162154		
KP162161		
KP162153		
KP162159		
KP162151		
KP162155		
KP162150		
KP162152		
KP162157		
KP162162		
KY359408		
AY221515		
KP162158		

تغییرات فیزیکی و شیمیایی و تغییرات پس از ترجمه نقطه ایزو الکتریک (PI) پروتئین، پایداری آن در برابر حرارت (Aliphatic index)، پایداری در لوله آزمایش (Instability index) و در بدن یک موجود زنده (Half-life) و هم‌چنین آب‌دوستی و آبگریزی (Gravy) با استفاده از سایت protparam برای تمام توالی‌های ملیتین و هم‌چنین پروتئین‌های P24 دو ویروس HIV و SIV انجام شد. ابتدا توالی‌ها با فرمت FASTA در نرم‌افزار آنالیز protparam ثبت شدند سپس نتایج هر توالی جداگانه در نرم‌افزار Excel وارد شدند (23,22).

پیش‌بینی جایگاه‌های پیوند دی‌سولفید و تغییرات پس ترجمه‌ای

جایگاه‌های پیوند دی‌سولفید از طریق سایت "DiANNA" (24) پیش‌بینی شد. به‌منظور پیش‌بینی جایگاه‌های فسفوریلاسیون از سایت "DISPHOS" (25)

و "NetPhos" (26) استفاده شد. از "GlycoEP" (27) و "NetNGlyc" (28) برای پیش‌بینی جایگاه‌های N-glycosylation استفاده شد. برای تعیین مشخصات کلی هر کدام از پروتئین‌های مورد بررسی از نرم‌افزارهای مشخصی برای تعیین تغییرات پسا ترجمه ای استفاده شد، که نتایج آن می‌تواند درک بهتری از ساختار و عملکرد این پروتئین‌ها ارائه دهد. پیوندهای دی سولفید در تشکیل ساختار یک پروتئین و در نهایت امکان برهم کنش این پروتئین نقش کلیدی بازی می‌کند و بررسی تغییرات در تعداد و محل تشکیل آن‌ها در فهم بهتر شرایط یک پروتئین بسیار یاری‌دهنده است. فرایند فسفوریلاسیون نیز در عملکرد پروتئین‌ها نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند که شامل مهار فرایندهای ایمنی‌زایی، انتقال سیگنال‌های سلولی و همچنین تاثیر آن روی برهم کنش پروتئین و لیگاند است. در این مطالعه نیز این فرایند در تمام پروتئین‌های مورد بررسی تعیین شد که نتایج آن می‌تواند روی برهم کنش پروتئین‌ملیتین و پروتئین P24 موثر واقع شود. فرایند گلیکوزیلاسیون از فرایندهای کلیدی در تعیین ساختار، عملکرد و پایداری یک پروتئین است. از نظر ساختاری این فرایند بر پیکربندی سه بعدی یک پروتئین بسیار موثر است که به ویژه تاثیر عمده‌ای روی برهم کنش‌های پروتئین-پروتئین که در این مطالعه بررسی می‌شود، دارد. هم‌چنین بررسی تمام فرایندهای پسا ترجمه‌ای می‌تواند به محققان در زمینه استفاده از این پروتئین‌ها در فرایندهای کلونینگ و بیان و تخلیص پروتئین و هم‌چنین تعیین میزبان مناسب برای بیان هر کدام از پروتئین‌ها کمک کند.

پیش‌بینی ساختار دوم و ساختار سوم پروتئین از "SOPMA" (29) برای پیش‌بینی ساختار دوم استفاده شد و برای ساخت ساختار سه‌بعدی پروتئین از سایت "I-TASSER" (30) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داکینگ

از طریق برنامه HEX docking برهم کنش بین پروتئین‌های ملیتین و P24 SIV و هم‌چنین پروتئین ملیتین و P24HIV بررسی شد.

بررسی دینامیک مولکولی

برای بررسی دینامیک مولکولی از نرم‌افزار GROMACS استفاده شد، در ابتدا از یون‌های سدیم به جای مولکول‌های آب برای تعادل و خشتی‌سازی سیستم استفاده شد. زمان شبیه‌سازی در این بررسی 10 نانو ثانیه با گام‌های 2 پیکو ثانیه‌ای در نظر گرفته شد.

بررسی هم‌ترازی

برای بررسی هم‌ترازی ساختار سوم پروتئین P24 دو ویروس HIV و SIV با استفاده از نرم‌افزار TM-align انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد (IR.SUMS.REC.1397.314) تصویب شده است. آدرس تمام سایت‌های استفاده‌شده در این مطالعه در جدول شماره 2 قرار داده شد.

جدول شماره 2: آدرس سرورها و سایت‌های مورد استفاده در این مطالعه به همراه آدرس اینترنتی و عملکرد هر یک از آن‌ها

عنوان برنامه	آدرس URL	عملکرد
protparam	http://expasy.org/tools/protparam.html	بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین
DiANNA	http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA	تعیین جایگاه‌های پیوند دی سولفید
DISPHOS	http://www.dabi.temple.edu/dispfos/pred.html	تعیین جایگاه‌های فسفوریلاسیون
NetPhos	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos	تعیین جایگاه‌های فسفوریلاسیون
NetNGlyc	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc	تعیین جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون
GlycoEP	http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html	تعیین جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون
SOPMA	http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	تعیین ساختار دوم
I-TASSER	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER	تعیین ساختار سوم
TM-align	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/	هم‌ترازی دو ساختار سوم پروتئین

یافته ها

تغییرات آمینواسیدها

توالی آمینواسیدها در مقایسه با توالی مرجع مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج نشان دهنده چندین جایگزینی در پروتئین های ملیتین و P24 SIV و HIV را نشان می دهد و به ترتیب در جداول شماره 3 و 4 و 5 نشان داده شده اند.

جدول شماره 3: تغییرات آمینواسیدی در پروتئین P24 ویروس SIV در مقایسه با توالی مرجع نشان داده شده است. بیش ترین فراوانی مربوط به جایگاه 117 می باشد که در 10 نمونه از نمونه های مورد بررسی یافت شده است

موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی
V5I	1	P 88 X	1	H 117 Y	10
V5X	1	L 89 P	1	H 117 X	1
Y9H	1	L 89 I	1	L 135 V	1
S 15 N	1	P 90 Q	1	L 135 X	1
V 26 I	1	A 91 Q	1	P 159 S	6
S 37 P	2	A 91 P	1	P 159X	5
T 47 I	1	S 98 X	2	Q161X	1
E 60 D	1	S 98 R	2	P 178 A	1
E 70 D	1	S 98 T	2	M 206 V	1
L 81 V	2	S 98 G	1	I 220 V	1
L 81 X	1	T 108 S	1		
G 87 X	1	V 109 X	1		
G 87 N	1	V 109 A	1		
G 87 A	1	E 110 D	1		

جدول شماره 4: تغییرات آمینواسیدها در پروتئین ملیتین با مقایسه سه توالی مورد استفاده در این مطالعه، مناطقی که دچار تغییر شده اند به صورت بولد نشان داده شده است

شماره ثبت توالی	توالی پروتئین
NM001011607	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
AF487907	GIGAVLKVLTTGLPALIGWIKRKRQQ
003689966 XP	GIGAILKVLATGLPTLIGWIKNRKQ

جدول شماره 5: تغییرات آمینواسیدها در پروتئین p24 ویروس HIV در مقایسه با توالی مرجع نشان داده شده است، بیش ترین فراوانی در جایگاه های 17، 52 و 212 اتفاق افتاده است

موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی
V 5 I	2	I 85 V	1	T 165 A	1
A 8 S	1	A 86 P	1	S 172 T	1
A 8 N	1	M 90 I	2	N 177 G	1
I 9 L	2	T 101 A	1	N 177 S	1
R 17 W	3	L 105 P	2	E 181 D	1
V 21 I	2	I 109 L	1	V 185 I	1
S 35 T	1	G 110 A	1	T 194 S	2
T 48 M	1	G 110 Q	1	K 197 R	1
T 48 V	1	N 114 G	1	P 201 S	1
T 52 I	3	E 122 D	2	G 202 A	1
E 65 D	2	T 142 V	1	S 212 C	3
V 77 M	1	R 148 K	2		
V 77 L	1	P 154 X	1		
H 81 Q	1	Y 163 F	2		

در مورد پروتئین P24 ویروس SIV تغییر اسید آمینه در جایگاه 117 مهم ترین موتاسیون یافت شده بود. در مورد پروتئین ملیتین، 6 جایگاه تغییر اسیدهای آمینه یافت شدند و در مورد پروتئین p24 ویروس HIV نیز موتاسیون های متعددی یافت شد که بیش ترین فراوانی در جایگاه های 17، 52 و 212 اتفاق افتاده بود.

نتایج "Protparam"

نتایج آنالیز pI نشان داد که پروتئین P24 دو ویروس HIV و SIV یک پپتید قلبیایی است و پروتئین ملیتین یک پپتید اسیدی است. شاخص آبگریزی نشان داد پروتئین P24 یک پروتئین کاملاً آب دوست است و پروتئین ملیتین زنبور عسل گونه های سرنا و ملیفرا پروتئین کاملاً آبگریزی است. هم چنین موتاسیون های یافت شده در این دو پروتئین هیچ تاثیری بر خواص فیزیکی و شیمیایی این دو پروتئین ندارد (جدول شماره 6). بررسی خواص آبدوستی و آبگریزی هر کدام از این پروتئین ها به درک بهتری از جایگاه آن ها در سلول و هم چنین تعیین این موضوع که پروتئین ها در معرض (expose) اتصال به لیگاند هستند، بسیار حیاتی هستند. در این مطالعه نیز به علت آب دوست بودن پروتئین P24 در هر دو ویروس، احتمال امکان در معرض بودن آن و هم چنین اتصال آن به پروتئین ملیتین بالاست.

آنالیز تغییرات پس ترجمه ای

در پروتئین های مورد بررسی، جایگاه های فسفریله شدن اسیدهای آمینه سرین و ترونین و تیروزین از طریق سایت های "NETPHOS" "DISPHOS" مشخص شد که در جدول شماره 7 بیان شد، که نتایج نشان دهنده جایگاه های متعددی برای پروتئین های مورد بررسی بود. در مورد پروتئین P24 در انواع ساب تایپ های ویروس HIV جایگاه های ۱۴۳، ۱۴۰، ۲۷، ۱۷۲ و ۱۷۲ در همه ساب تایپ های این ویروس یافت شدند که نشان دهنده حفاظت شده بودن این نواحی می باشند و هم چنین نشان از اهمیت بالای آن ها در ساختار و عملکرد این پروتئین

دارد. هم چنین جایگاه های اتصال قند به پروتئین به وسیله سایت های "NETGLYCO" و "GLYCOEP" مشخص شدند. نتایج نشان دهنده دو جایگاه اتصال قند (207,145) به پروتئین P24 و ویروس SIV بود. در ضمن تفاوت در جایگاه اتصال قند در پروتئین P24 ساب تایپ های مختلف ویروس HIV مشاهده شد، که نشان دهنده تاثیر موتاسیون های بر جایگاه اتصال قند در پروتئین P24 این ویروس است، در حالی که این موتاسیون ها هیچ تاثیری بر جایگاه های اتصال قند در پروتئین P24 ویروس SIV نداشتند. با توجه به تاثیر فرایند گلیکوزیلایسیون بر پیکربندی سه بعدی یک پروتئین و در نهایت تاثیر آن روی برهم کنش پروتئین با پروتئین، تفاوت در جایگاه اتصال قند به پروتئین P24 در دو ویروس HIV و SIV می تواند بیانگر تفاوت در نوع و قدرت اتصال این پروتئین با پروتئین ملتین باشد. بررسی پروتئین ملتین نشان داد که هیچ تغییر پس ترجمه ای در این پروتئین وجود ندارد.

نتایج سایت های بررسی کننده جایگاه پیوند دی سولفید نشان دهنده دو جایگاه پیوند دی سولفید است که در پروتئین ملتین این پیوند وجود نداشت، ولی در پپتید P24 دو پیوند مشخص شد که در جدول شماره 7 نشان داده شده است. در پپتید HIV در جایگاه 212 در همه انواع آن موتاسیون S به C اتفاق افتاده است و همین باعث ایجاد پیوند دی سولفیدی در آن ها شده است.

پیش بینی ساختار دوم

تجزیه و تحلیل داده ها مشخص کرد که بیش ترین ساختار پروتئین ملتین به ترتیب آلفاهلیکس و بتا ترن است و پروتئین P24 SIV آلفا هلیکس و رندوم کوئل است و هم چنین تجزیه و تحلیل توالی های پروتئین HIV P24 نشان داد که بیش ترین ساختار این پروتئین به ترتیب آلفاهلیکس و رندوم کوئل است. وجود جایگزینی ها در توالی HIV A1 باعث تغییر در ساختار دوم شده است (جدول شماره 8).

جدول شماره 6: نتایج "Protparam" پروتئین P24 و پروتئین ملتین نشان داده شده است، که شامل وزن مولکولی، pI، نیمه عمر پروتئین، پایداری و خواص آبگریزی این دو پروتئین می باشد

Protparam	P24 (SIV)	ملتین (فلورنا)	ملتین (سرنا)	ملتین (ملفرا)	P24 (Reference HIV)	P24 (HIV subtype A)	P24 (HIV subtype B)	P24 (HIV subtype AD)
وزن مولکولی (دالتون)	25732	2819	2817	2847	2397	23617	23657	23615
نقطه ایزوالکتریک	6/14	11/33	12/02	12/02	5/86	5/61	5/63	5/44
نیمه عمر پروتئین	20 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	30 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	30 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	30 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	1 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	1 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	1 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران	1 ساعت در رتیکولوسیت های پستانداران
	20 ساعت در مخمر	20 ساعت در مخمر	20 ساعت در مخمر	10 ساعت در مخمر	10 ساعت در مخمر	10 ساعت در مخمر	10 ساعت در مخمر	10 ساعت در مخمر
	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در	10 ساعت در
	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>	باکتری <i>E.coli</i>
شاخص ناپایداری	ناپایدار	پایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار
شاخص آلفا بیک	82/6	138/85	135	135	79/62	84/25	80	82/41
شاخص آب گریزی	-0/44	-0/308	0/288	0/273	-0/393	-0/306	-0/35	-0/295
تعداد اسید های آمینه	230	26	26	26	212	212	212	212

جدول شماره 7: نتایج بررسی جایگاه های فسفوریلاسیون و گلیکوزیلایسیون و پیوندهای دی سولفید پروتئین P24 ویروس های HIV و SIV نشان داده شده اند

فسفوریلاسیون	P24 (SIV)	P24 (HIV subtype A)	P24 (HIV subtype B)	P24 (HIV subtype AD)
سورین	107-170-162-100-98-43-15	-177-143-140-96-38-27-10	172-143-140-96-38-27	172-143-140-96-38-27-10
ترونین	176-108-106-47	104-42	204-165-42	165-104-42
تیروزین	163-168-49			
گلیکوزیلایسیون	207-145	103-96-8	101	101
باند های دی سولفید	217-140, 207-197	212-192	212-192	212-192

جدول شماره 8: نتایج بررسی ساختار دوم در پروتئین ملتین در سه گونه زنبور عسل و همچنین پروتئین P24 در ویروس HIV و SIV نمایش داده شده است

SOPMA	P24 (SIV)	ملتین (فلورنا)	ملتین (سرنا)	ملتین (ملفرا)	P24 (HIV subtype A)	P24 (HIV subtype B)	P24 (HIV subtype AD)
ماریچ آلفا (درصد)	47/39	46/15	50	53/8	53/30	51/42	53/77
رشته ممند (درصد)	12/17	19/23	11/50	8/49	7/70	10/85	9/43
چرخش بتا (درصد)	8/70	19/3	23	26/90	10/85	8/49	8/49
پیچ تصادفی (درصد)	31/74	15/38	15/40	11/50	27/36	29/25	28/30

ویروس HIV و SIV و همچنین پروتئین ملیتین با استفاده از نرم افزار A.I-TASSER: پروتئین P24 ویروس SIV، B: پروتئین P24 ویروس HIV، و C: پروتئین ملیتین

جدول شماره 9: نتایج بررسی کیفیت ساختارهای سوم پروتئین های P24 و ملیتین با استفاده از روش های Ramachandran و QMEAN نشان داده شده است، که نشان دهنده کیفیت مناسب این ساختارهای پیشنهادی می باشد. با توجه به این که در نتایج نقشه Ramachandran در اکثر نمونه ها نزدیک به 90 درصد اسیدهای آمینه در منطقه مطلوب قرار گرفته اند و هم چنین امتیاز QMEAN نیز در اکثر نمونه های نزدیک به صفر است، لذا می توان نتیجه گرفت که این ساختارها از کیفیت بالایی برخوردار هستند

ملیتین (ملیفرا)	ملیتین (سرنا)	ملیتین (غورنا)	P24 (HIV)	P24 (SIV)
91/77	91/7	83/3	93/3	87/3
8/3	8/3	16/7	5/7	9/6
-0/93	-1/15	-1/13	-2/07	-3/4
Qmean امتیاز				

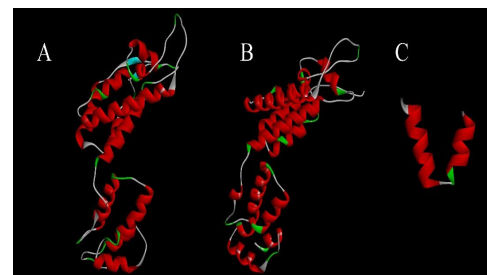
نتایج داکینگ

نتایج بررسی داکینگ برهم کنش پروتئین ملیتین از گونه های زنبور مورد بررسی و پروتئین P24 دو ویروس SIV و HIV در جدول شماره 10 نمایش داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، به صورت کلی می توان نتیجه گیری کرد که پروتئین ملیتین اتصال قوی با پروتئین P24 هر دو ویروس مورد بررسی می تواند برقرار کند. پایدارترین برهم کنش (بالا ترین انرژی برهم کنش) مربوط به پروتئین P24 ویروس HIV و ساب تایپ B و ملیتین گونه سرنا بود. نتایج برهم کنش ملیتین و P24 ویروس SIV نشان داد که، موتاسیون های مورد بررسی در توالی های موتانت تاثیر چندانی روی برهم کنش بین این دو پروتئین ندارند. به علاوه ساب تایپ های مختلف HIV نیز، برهم کنش های تقریباً مشابه ای با انواع ملیتین نشان دادند که این نتیجه می تواند بیان کننده آن باشد که منطقه اتصال بین دو پروتئین منطقه ای حفظ شده از لحاظ ژنتیکی و تکاملی باشد. با توجه به انرژی های اتصال می توان نتیجه گرفت پروتئین ملیتین گونه سرنا به صورت کلی اتصال قوی تری با پروتئین P24 دو ویروس HIV و SIV بر قرار می کند و می تواند گزینه مناسب تری برای مهار این

در تمام موارد قسمت اصلی پروتئین های مورد بررسی شامل مارپیچ آلفا می باشد. بررسی ساختار دوم نشان دهنده تفاوت ساختار پروتئین ملیتین در سه گونه زنبور عسل می باشد که به علت وجود تغییرات در سطح اسید آمینه این پروتئین است. در حالی که درصد پیچ آلفا در ملیفرا در حدود 53/8 می باشد این میزان به 50 درصد در سرنا و همچنین 46 درصد در فلورنا کاهش یافته و این تغییرات در ساختار می تواند بر برهم کنش این پروتئین ها با پروتئین P24 تاثیر گذار باشند. هم چنین بررسی ساختار دوم در پروتئین P24 ویروس SIV و سه ساب تایپ ویروس HIV نشان دهنده تاثیر تغییرات در سطح اسیدها آمینه بر ساختار این پروتئین است که این امر نیز می تواند بر برهم کنش آن با پروتئین ملیتین موثر باشد.

ساختار سوم (3D)

ساختار نهایی پروتئین P24 دو ویروس SIV و HIV و هم چنین ملیتین در تصویر شماره 1 نمایش داده شد. جدول شماره 9 نشان دهنده نتایج بررسی کیفیت ساختارهای سوم پروتئین های ملیتین و ساختار سوم پروتئین P24 در دو ویروس HIV و SIV به وسیله برنامه های QMEAN و RAMACHANDRAN PLOT است. این تصویر نمایش دهنده ساختارهای نهایی سه پروتئین مورد بررسی در این مطالعه می باشد. در هر سه پروتئین قسمت اعظم ساختار به صورت مارپیچ آلفا و قرمز رنگ نمایش داده شده است و دیگر ساختارها، صفحات بتا به صورت آبی رنگ، پیچ تصادفی به صورت سفید رنگ و چرخش بتا به صورت سبز رنگ به تصویر کشیده شده است.



تصویر شماره 1: نتایج نهایی تعیین ساختار سوم پروتئین P24 در دو

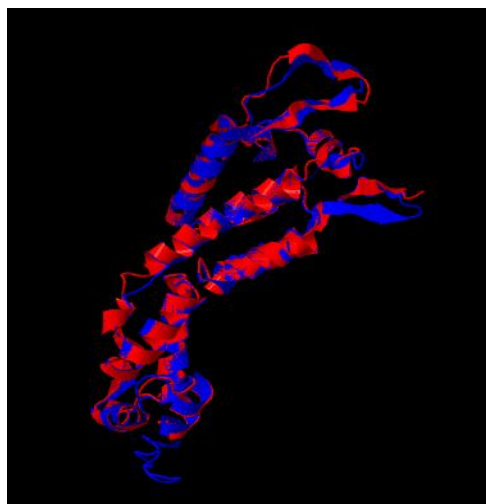
نتایج دینامیک مولکولی

برای بررسی دینامیک ابتدا بهینه‌سازی انرژی از لحاظ مولکولی انجام شد و پس از رسیدن به پایداری در حدود زمان‌های 4 تا 6 نانوثانیه انرژی پتانسیل همگرا شد. از معیار RMSD برای نشان دادن پایداری سیستم در بررسی‌های دینامیک مولکولی استفاده شد، که از زمان 6 نانوثانیه این مقدار بسیار پایین و نزدیک به صفر (0/0014) بوده که نشان‌دهنده رفتار مناسب سیستم مولکولی می‌باشد.

بررسی‌های هم‌ترازی ساختار پروتئین‌های P24 دو

ویروس SIV و HIV

و نتیجه هم‌ترازی پروتئین P24 دو ویروس HIV و SIV با استفاده از نرم‌افزار TM-align در تصویر شماره 3 نشان داده شد. TM-score در حدود 0/97 نشان‌دهنده آن است که هر دو پروتئین از لحاظ فولدینگ و ساختار فضایی بسیار مشابه یکدیگر هستند.

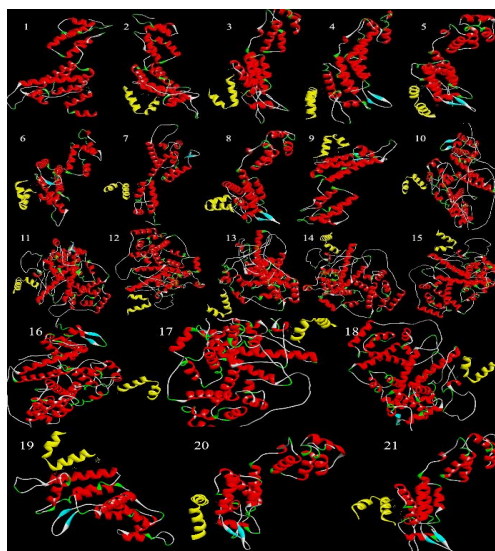


تصویر شماره 3: نتیجه هم‌ترازی ساختار سوم پروتئین P24 در دو ویروس HIV و SIV نشان‌دهنده تشابه بسیار بالایی ساختار سوم و فولدینگ این پروتئین در این دو ویروس است. با توجه به تشابه ساختاری این دو پروتئین انتظار می‌رود روند برهم‌کنش مشابهی بین این دو پروتئین و پروتئین ملیتین وجود داشته باشد. رنگ آبی پروتئین P24 در ویروس SIV و رنگ قرمز نشان‌دهنده پروتئین P24 در ویروس HIV می‌باشد.

پروتئین باشد. تصاویر برهم‌کنش بین پروتئین ملیتین و پروتئین P24 دو ویروس SIV و HIV در تصاویر شماره 2 نمایش داده شده است.

جدول شماره 10: نتایج برهم‌کنش‌های بین پروتئین ملیتین و دو پروتئین SIV و HIV بیان شده است. انرژی برهم‌کنش بین پروتئین‌ها نشان‌دهنده اتصال قوی بین پروتئین‌های مورد بررسی بود و بیش‌ترین انرژی اتصال مربوط به پروتئین P24 ویروس HIV و پروتئین ملیتین از زنیور عسل گونه سرنا بود.

ملیتین (فلورنا)	ملیتین (سرنا)	ملیتین (ملیغرا)
-355	-350	-367
P24(SIV-mutant 117)		
-310/9	-332	-292
P24(SIV-mutant 159S)		
-368	-385	-369
P24(SIV-mutant 159X)		
-339/9	-378	-371/3
P24(SIV مرجع)		
-409/1	-379/9	-361/3
P24(HIV subtype AD)		
-393/9	-411/2	-397/8
P24(HIV subtype A)		
-357	-417/3	-377/8
P24(HIV subtype B)		



تصویر شماره 2: نتایج داکینگ پروتئین‌های ملیتین و P24،
1: موتانت 117 با ملیتین (فلورنا)، 2: موتانت 117 با ملیتین (سرنا)،
3: موتانت 117 با ملیتین (ملیغرا)، 4: موتانت 159s با ملیتین (فلورنا)،
5: موتانت 159s با ملیتین (سرنا)، 6: موتانت 159s با ملیتین (ملیغرا)،
7: موتانت 159x با ملیتین (فلورنا)، 8: موتانت 159x با ملیتین (سرنا)،
9: موتانت 159x با ملیتین (ملیغرا)، 10: P24 (AD) با ملیتین (فلورنا)،
11: P24 (AD) با ملیتین (سرنا)، 12: P24 (AD) با ملیتین (ملیغرا)،
13: P24(A) با ملیتین (فلورنا)، 14: P24(A) با ملیتین (سرنا)،
15: P24 (AD) با ملیتین (ملیغرا)، 16: P24 (B) با ملیتین (فلورنا)،
17: P24 (B) با ملیتین (سرنا)، 18: P24 (B) با ملیتین (ملیغرا)،
19: P24(SIV) با ملیتین (فلورنا)، 20: P24(SIV) با ملیتین (سرنا)،
21: P24(SIV) با ملیتین (ملیغرا).

بحث

هر چند گونه‌های متعدد زنبور عسل در مناطق مختلف جهان یافت شده‌اند اما سه گونه *Apis cerana*، *Apis mellifera* و *Apis florea* از گونه‌های با گستره بالا در جهان می‌باشند و در این مطالعه نیز ملیتین مرتبط با این سه گونه مورد بررسی قرار گرفتند. *Apis cerana* به زنبور عسل آسیایی معروف است و در شرق ایران زندگی می‌کند (31). *Apis mellifera* که به زنبور عسل غربی معروف است اندازه متوسطی دارد و در زیستگاه‌ها و اقلیم‌های مختلفی زندگی می‌کند (32).

Apis florea زنبور عسل کوچکی است که بیش تر در جنوب شرقی آسیا و خاورمیانه زندگی می‌کند (32). هر چند این سه گونه دارای جد مشترکی هستند ولی از لحاظ توالی ملیتین تغییراتی دارند.

در سال 1970 اولین گزارش‌ها در مورد عملکرد زنبور عسل منتشر شد و بیان شد که بخشی از زهر زنبور که ملیتین نامیده می‌شود خاصیت ضد سرطانی و ضد میکروبی و همچنین لیز سلولی دارد (33).

برای پروتئین ملیتین فعالیت‌های ضد ویروسی متعددی بیان شده است، این پروتئین باعث تغییر فعالیت‌های درون سلولی شده که به صورت انتخابی تولید یک سری از پروتئین‌های ویروسی را کاهش می‌دهد. در دهه 90 میلادی قابلیت این پروتئین به عنوان یک ترکیب مکمل همراه با azidothymidine برای مهار عملکرد آنزیم reverse transcriptase ویروس ایدز تأیید شد که توانست اثر مهاری بر رشد ویروس داشته باشد (13). هم چنین اخیراً این پروتئین در ساختاری از نانوذره‌ها به عنوان داروی موضعی برای مهار ویروس ایدز به کار رفته‌اند (34). در مطالعه حاضر مشخص شد نزدیک به 50 درصد ساختار ملیتین از آلفا هلیکس تشکیل شده است. هم چنین در ساختار سوم پیش‌بینی شده با نرم افزار I-Tasser وجود دو ساختار آلفا هلیکس به وضوح مشخص شده است.

Terwilliger و همکارانش ساختار ملیتین را با اشعه ایکس تجزیه و تحلیل کردند و مشخص شد که پروتئین

ملیتین از چهار زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده است که هر زنجیره شامل دو ساختار آلفا هلیکس است که با نتایج بررسی حاضر تشابه دارد (15).

در سال 2019، Ramirez و همکاران با استفاده از روش بیوشیمیایی NMR ساختار پروتئین ملیتین را مورد بررسی قرار دادند، مشابه با نتایج مطالعه حاضر، نتایج نشان دهنده ساختار مارپیچ آلفا و نیز پیچ تصادفی در این پروتئین بود (35).

مشابه با نتایج مطالعه حاضر، Terwilliger و همکاران نیز خواص آب دوستی پروتئین ملیتین را با روش‌های کریستالوگرافی نشان دادند، هم چنین نتایج آن‌ها نشان‌دهنده ساختار مارپیچی این پروتئین نیز بود (36). به علاوه، دو مطالعه دیگر توسط دهقانی و همکاران و Ceremuga و همکاران با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی موید نتایج مطالعه حاضر در مورد ساختار و هم چنین خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین ملیتین بود (37).

Shi و همکارانش در سال 2004 پایداری این پروتئین را در باکتری *E. coli* بررسی کردند و پایداری آن را در این میزان تأیید کردند. داده‌های ما نشان داد که هر دو پپتید Melittin و SIV P24 در سلول پستانداران و مخمر پایداری دارند اما پپتید HIV P24 در این میزبان‌ها پایدار نیست و در باکتری *E. coli* فقط پروتئین‌های Melittin و HIV P24 پایدار هستند (38).

Instability index پایداری پروتئین را در لوله آزمایش تخمین می‌زند که بر اساس یافته‌ها تمام پروتئین‌های بررسی شده در این مطالعه در لوله آزمایش ناپایدارند به جز یکی از گونه‌های پپتید ملیتین از گروه فلورا که پایدار است. این پپتید توالی آمینواسیدی متفاوتی نسبت به دو نوع ملیتین دیگر دارد و همچنین پایداری پپتید HIV AD35 نسبت به گونه‌های دیگر HIV بیش تر است و این بررسی‌ها نشان می‌دهد که ملیتین استخراج شده از *Apis florea* مناسب برای بررسی‌های آزمایشگاهی است.

Aliphatic index عاملی است که پایداری یک

پروتئین را در دماهای بالا نشان می‌دهد و بر اساس یافته‌ها تمام پروتئین‌ها در دمای بالا پایداری فلورا نسبت به دیگر گونه‌های ملیتین و پپتید HIV 1A نسبت به گونه‌های دیگر HIV پایدارتر است.

نتایج پیش‌بینی جایگاه‌های تغییرات پس ترجمه‌ای برای پروتئین P24 نشان می‌دهد جایگاه‌های متعددی تحت تأثیر این فرایندها قرار گرفته‌اند. 14 آمینو اسید به‌عنوان جایگاه‌های فسفوریلاسیون در پروتئین P24 و ویروس SIV پیش‌بینی شده‌اند و همچنین در ویروس HIV حداقل 8 جایگاه تحت تأثیر این فرایند قرار گرفته است. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که این فرایند در فرایند uncoating ویروس و تکثیر آن در سلول میزبان نقش بسیار حیاتی را بازی می‌کند. همچنین آمینو اسید 101 در پروتئین P24 ویروس HIV و جایگاه‌های 145 و 207 در ویروس SIV جایگاه‌های فرایند گلیکوزیلاسیون بودند. گلیکوزیلاسیون نقش مهمی در بیماری‌زایی و توانایی ویروس در زنده ماندن در سلول دارد. پیوندهای دی سولفید یکی از اجزای مهم در تشکیل ساختار سوم پروتئین است و نیز نقش مهمی در عملکرد پروتئین‌های مختلف دارد، نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد حداقل یک پیوند دی سولفید در پروتئین P24 ویروس HIV و دو پیوند دی سولفید در P24 ویروس SIV وجود دارد.

نتایج داکینگ بین پروتئین P24 در دو ویروس HIV و SIV با پروتئین ملیتین نشان داد پروتئین ملیتین با انرژی بالایی به این پروتئین در هر دو ویروس متصل می‌شود. موتاسیون در پروتئین P24 در ویروس SIV تأثیر چندانی در تغییر این اتصال ندارد و همچنین پروتئین ملیتین در سه گونه زنبور با انرژی تقریباً مشابهی به پروتئین P24 دو ویروس SIV و HIV اتصال می‌یابد. به همین صورت پروتئین P24 در سه ساب تایپ مورد بررسی با انرژی تقریباً مشابهی به پروتئین ملیتین متصل می‌گردد. نتایج بررسی دینامیک مولکولی برهم کنش پروتئین‌های ملیتین و P24 نیز نشان‌دهنده پایداری مولکولی مناسب

این برهم‌کنش‌ها بود و موید نتایج به‌دست آمده در داکینگ بود.

تحقیقات بر روی ویروس SIV همواره به عنوان تحقیقات بنیادی برای مهار ویروس ایدز در انسان مطرح بوده است و هر گونه موفقیت در مهار این ویروس در پرمات‌ها می‌تواند راهی برای درمان ویروس ایدز در انسان باشد. با توجه به تشابه ساختاری و ژنومی این دو ویروس، انتظار می‌رود مهارکنندگان تأثیر تقریباً مشابهی بر مهار این دو ویروس داشته باشند. با توجه به این پیش‌زمینه در این مطالعه با بررسی پروتئین اصلی کپسید، پروتئین P24، در دو ویروس SIV و HIV و بررسی تشابه این پروتئین از لحاظ توالی و همچنین ساختاری، زمینه‌های متفاوتی برای مطالعه مهارکننده طبیعی ملیتین ایجاد شده است.

مطالعات متعددی نشان دهنده تأثیر مهار پروتئین ملیتین بر روی پوشش ویروس ایدز بوده است. همچنین پیشنهاداتی در مورد امکان تأثیر این پروتئین بر روی دیگر اجزای این ویروس ارائه شده است.

در این مطالعه به بررسی برهم‌کنش این پروتئین با پروتئین P24 که جزء مهمی از ساختار کپسید ویروس ایدز است، پرداختیم. نتایج نشان می‌دهد هرچند در سطح آمینو اسید تفاوت بالایی بین پروتئین P24 در این دو ویروس مشاهده می‌شود، اما از لحاظ فولدینگ و ساختار سوم این دو پروتئین بسیار مشابه هستند که این امر می‌تواند تفسیری برای نتایج مشابه اتصال پروتئین ملیتین با این پروتئین در دو ویروس باشد.

با توجه به محدودیت نمونه‌های حیوانی برای تست‌های آزمایشگاهی ویروس ایدز بررسی هر مهارکننده‌ای بر روی ویروس SIV در پرمات‌ها می‌تواند الگوی مناسبی برای مهار ویروس ایدز ارائه دهد. لذا با توجه به نتایج این مطالعه، انتظار می‌رود استفاده از پروتئین ملیتین برای مهار ویروس SIV در پرمات‌ها نتایج قابل قبولی را در پی داشته باشد که به نوبه خود می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای مهار ویروس ایدز نیز استفاده گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد و بخشی از طرح مصوب (به شماره:

1396-01-21-16321) این دانشگاه می باشد. نویسندگان این مطالعه کمال تشکر از از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی شیراز را دارند.

References

1. Miller RJ, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol* 2000; 74(16): 7187-7195.
2. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1(1): a006841.
3. D'arc M, Ayoub A, Esteban A, Learn GH, Boué V, Liegeois F, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(11): E1343-E1352.
4. Stephens EB, Mukherjee S, Liu ZQ, Sheffer D, Lamb-Wharton R, Leung K, et al. Simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the nef/long terminal repeat region of the highly virulent SIV_{smm}PBj14 causes PBj-like activation of cultured resting peripheral blood mononuclear cells, but the chimera showed No increase in virulence. *J Virol* 1998; 72(6): 5207-5214.
5. Ndung'u T, Lu Y, Renjifo B, Touzjian N, Kushner N, Pena-Cruz V, et al. Infectious simian/human immunodeficiency virus with human immunodeficiency virus type 1 subtype C from an African isolate: rhesus macaque model. *J Virol* 2001; 75(23): 11417-11425.
6. Williams KC, Burdo TH. HIV and SIV infection: the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *APMIS* 2009; 117(5-6): 400-412.
7. Sun Y, Permar SR, Buzby AP, Letvin NL. Memory CD4⁺T-lymphocyte loss and dysfunction during primary simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2007; 81(15): 8009-8015.
8. Frieden TR, Das-Douglas M, Kellerman SE, Henning KJ. Applying public health principles to the HIV epidemic. *N Engl J Med* 2005; 353: 2397-2402.
9. Dehghani A, Dehghani P, Dehghani B. HIV/AIDS Knowledge and Attitude among High School Students in Shiraz, Iran in 2015. *J Midwifery Reprod Health* 2017; 5(2): 897-903.
10. Behzad D, Zahra H, Tayebbeh H, Parvin Afsar K. Subtype Classification by Polymerase and Gag Genes of HIV-1 Iranian Sequences Registered in the NCBI GenBank. *Curr Proteom* 2021; 18(2): 153-161.
11. Dehghani B, Dehghani A, Sarvari J. Knowledge and Awareness Regarding Hepatitis B, Hepatitis C, and Human Immunodeficiency Viruses Among College Students: A Report From Iran. *Int Q Community Health Educ* 2019; 41(1): 15-23.
12. Heinen TE, da Veiga ABG. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 2011; 57(4): 497-511.
13. Moreno M, Giralt E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins* 2015; 7(4): 1126-1150.
14. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmacol* 2017; 8: 412.
15. Terwilliger TC, Weissman L, Eisenberg D. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic

- and surface activities. *Biophys J* 1982; 37(1): 353-361.
16. Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T. HIV Capsid and Protease, New Targets of Melittin. *Int J Pept Res Ther* 2020; 26: 2057-2065
 17. Fujii G, Horvath S, Woodward S, Eiserling F, Eisenberg D. A molecular model for membrane fusion based on solution studies of an amphiphilic peptide from HIV gp41. *Protein Sci* 1992; 1(11): 1454-1464.
 18. Apellániz B, Ivankin A, Nir S, Gidalevitz D, Nieva JL. Membrane-proximal external HIV-1 gp41 motif adapted for destabilizing the highly rigid viral envelope. *Biophys J* 2011; 101(10): 2426-2435.
 19. Memariani H, Memariani M, Moravvej H, Shahidi-Dadras M. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(1): 5-17.
 20. Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther* 2013; 18(1): 95-103.
 21. Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, von Pechmann N, Ludvigsen A, Neumann M, et al. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J Gen Virol* 1998; 79(Pt 4): 731-740.
 22. Walker JM. The proteomics protocols handbook. Berlin: Springer; 2005.
 23. Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z, Rasooli I. Immunogenicity, antigenicity and epitope mapping of Salmonella InvH protein: An in silico study. *J Curr Biomed Rep* 2020; 1(2): 81.
 24. Ferrè F, Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(suppl_2): W182-W185.
 25. Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, et al. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(3): 1037-1049.
 26. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294(5): 1351-1362.
 27. Chauhan JS, Rao A, Raghava GP. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PloS One* 2013; 8(6): e67008.
 28. Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation Sites in Human Proteins, 2004. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Accessed May 2, 2021.
 29. Hashempour T, Dehghani B, Musavi Z, Moayedi J, Hasanshahi Z, Sarvari J, et al. Impact of IL28 Genotypes and Modeling the Interactions of HCV Core Protein on Treatment of Hepatitis C. *Interdiscip Sci* 2020; 12(4): 424-437.
 30. Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T, Motamedifar M. The possible regions to design Human Papilloma Viruses vaccine in Iranian L1 protein. *Biologia (Bratisl)* 2020; 75(5): 749-759.
 31. Oldroyd BP, Wongsiri S. Asian honey bees: biology, conservation, and human interactions: London: Harvard University Press; 2009.
 32. Gupta RK. Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: Gupta RK, editors. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security*. Berlin: Springer; 2014. p. 63-103.
 33. Habermann E, Kowallek H. Modifications of amino groups and tryptophan in melittin as

- an aid to recognition of structure-activity relationships. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1970; 351(7): 884-890.
34. Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther* 2013; 18(1): 95-103.
 35. Ramirez LS, Pande J, Shekhtman A. Helical Structure of Recombinant Melittin. *J Phys Chem B* 2019; 123(2): 356-368.
 36. Terwilliger TC, Eisenberg D. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem* 1982; 257(11): 6010-6015.
 37. Ceremuga M, Stela M, Janik E, Gorniak L, Synowiec E, Sliwinski T, et al. Melittin-A Natural Peptide from Bee Venom Which Induces Apoptosis in Human Leukaemia Cells. *Biomolecules* 2020; 10(2): 247.
 38. Shi W, Cheng J, Zhang C. Expression of the melittin gene of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) in insect cells. *Eur J Entomol* 2006; 103(4): 867-870.