

# استخراج و غربالگری محاسباتی پپتیدهای فعال‌کننده آپوپتوز از شیر با هدف بهینه‌سازی درمان سرطان

الناز چیت ساززاده<sup>۱</sup>، فرزانه محمدی فارسانی<sup>۲</sup> و محمدرضا گنجعلی خانی<sup>۱\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی نقش جهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱

## چکیده

پپتیدهای فعال زیستی مولکول‌هایی هستند که به طور طبیعی در ساختار پروتئین‌های غذایی وجود داشته و برای داشتن فعالیت زیستی باید توسط فرایند پروتئولیز آزاد و سپس از سیستم گوارشی جذب شده تا در مسیر مورد نظر تاثیر بگذارند. بررسی‌ها نشان داده است که این پپتیدها نقش گسترده‌ای در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان دارند. استفاده از پپتیدها به عنوان داروهای ضدسرطان جایگزین بهتری برای درمان است چرا که به طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند و اثر سمی کمتری برای بافت‌های طبیعی دارند. هدف از انجام این پژوهش شناسایی پپتیدهای فعال زیستی شیر و معرفی پپتیدهای درمانی جدید و بالقوه جهت درمان سرطان بر مبنای این منبع عظیم از پروتئین‌ها و پپتیدها است. با این هدف، ابتدا محتوای پروتئینی شیر، شامل ۷ پروتئین مورد شناسایی قرار گرفت و پپتیدهای فعال زیستی از این منبع استخراج شد. ساختار سه بعدی پپتیدها پیش‌بینی و کتابخانه‌ای شامل ۱۱۸ پپتید ساخته شد. سپس ۹ گیرنده پروتئین اصلی که اهداف درمان سرطان می‌باشند شناسایی شده و برهمکنش پپتیدهای استخراج شده آن‌ها بوسیله روش‌های داکینگ و غربالگری مجازی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پپتیدهای بالقوه درمان تجزیه و تحلیل شد. نتایج این پژوهش، منجر به شناسایی ۱۰ پپتید بالقوه درمانی استخراج شده از شیر گردید که نسبت به مهارکننده‌های شناخته شده و پرکاربرد، قدرت بیشتری در توقف عملکرد پروتئین‌های BCL2 و GSTA به عنوان اهداف درمانی سرطان دارند. دو پروتئین مذکور، نقش بسیار مهمی در گریز سلول‌های سرطانی از آپوپتوز، مقاومت دارویی به داروهای مبتنی بر پلاتین و سرطان‌زایی شیمیایی دارند.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای فعال زیستی، سرطان، آپوپتوز، داکینگ مولکولی، غربالگری مجازی

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [m.ganjalkhany@sci.ui.ac.ir](mailto:m.ganjalkhany@sci.ui.ac.ir)

## مقدمه

به طور کلی پپتیدهای فعال زیستی قطعاتی از پروتئین هستند که دارای اثرات مثبت بسیار بر عملکرد و فعالیت بدن بوده و می‌توانند سلامت افراد را بهبود ببخشند. این پپتیدها، از نظر عملکردی در پروتئین‌ها غیرفعال هستند و برای داشتن فعالیت زیستی خود باید توسط روش پروتئولیز آزاد شوند [۹]. پپتیدها به دلیل عواملی نظیر اندازه کوچک، سنتز راحت، فعالیت و ویژگی بالا و تنوع بیولوژیکی توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است [۲۵]. منبع این پپتیدها به دو دسته کلی منابع گیاهی و جانوری تقسیم می‌شوند. منابع جانوری شامل شیر، گوشت، ارگانیس‌های دریایی و تخم‌مرغ بوده و منابع گیاهی شامل حبوبات، غلات و دانه‌ها می‌باشند. شیر گاو، پنیر و محصولات لبنی، بزرگ‌ترین منبع خوراکی پپتیدهای فعال زیستی به شمار می‌آیند [۳۹]. پروتئین‌های شیر از دو دسته اصلی شامل پروتئین‌های نامحلول (خانواده کازئین) و پروتئین‌های محلول

(پروتئین‌های آب پنیر یا سرم) تشکیل شده‌اند. کازئین‌ها شامل  $\alpha_1$ ،  $\alpha_2$ ،  $\beta$  و  $\kappa$ -کازئین هستند، در حالی که پروتئین‌های سرم  $\alpha$ -لاکتالبومین<sup>۱</sup> و  $\beta$ -لاکتوگلوبولین<sup>۲</sup> هستند [۴۱]. تقریباً ۸۰٪ از پروتئین‌های شیر کازئین‌ها می‌باشند و مطالعات نشان داده است که کازئین دارای خاصیت ضد جهش‌زایی قوی بوده و این نکته از نظر پیشگیری از ایجاد سرطان حائز اهمیت می‌باشد. کازئین قوی‌ترین مهارکننده جهش‌زایی در بین پروتئین‌ها و مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی بوده و به نظر می‌رسد خاصیت ضد جهش‌زایی کازئین با ساختار و توالی مولکولی آن مرتبط می‌باشد. پروتئین‌های سرم حدود ۲۰٪ از کل پروتئین‌های شیر را تشکیل می‌دهند. در چندین پژوهش اثر پروتئین‌های سرم شیر بر روی سلول‌های سرطانی بررسی شده است. برای مثال بررسی‌ها نشان داده است که رشد رده سلولی MCF7 سرطان پستان پاستوریزه به استروژن انسانی<sup>۳</sup> و رده سلولی PC-3 سرطان پروستات به‌طور قابل‌توجهی توسط پروتئین‌های سرم کاهش می‌یابد [۳۵].

پپتیدهای فعال زیستی در توالی پروتئین‌های شیر به صورت پنهان و غیرفعال هستند و می‌بایست توسط یکی از سه روش زیر آزاد و فعال شوند: ۱- هیدرولیز به واسطه آنزیم‌های گوارشی ۲- هیدرولیز توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک میکروارگانیزم‌ها و ۳- هضم توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک به دست‌آمده از میکروارگانیزم‌ها یا گیاهان [۳۵].

به طور کلی پپتیدهای فعال زیستی ضدسرطان یک جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی هستند، زیرا هیچ عوارض جانبی ندارند یا عوارض جانبی بسیار کمی دارند و علاوه بر این هزینه تولید نسبتاً ارزان‌تری دارند. خاصیت ضدسرطانی پپتیدهای فعال زیستی تاکنون در مطالعات مختلف مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. از جمله این ترکیبات فعال زیستی می‌توان به پپتیدهای استخراج شده از قارچ‌های دریایی [۵۱]، پپتیدهای بدست‌آمده از ماهی تن [۴۷] و نیز پپتیدهای استخراج شده از تخم مرغ [۵۳] اشاره کرد. نکته قابل توجه آن است که تعدادی از پپتیدهای زیستی مورد مطالعه، توسط سازمان غذا و دارو<sup>۵</sup> (FDA) نیز مورد تایید قرار گرفته‌اند. در یک مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۲، عنوان شده است که در رده سال‌های ۲۰۱۵ الی ۲۰۱۹، حدود ۱۵ پپتید تایید FDA را دریافت نموده‌اند که حدود ۷ درصد کل داروهای تایید شده در طی سال‌های ذکر شده را شامل می‌شود. این پپتیدها امروزه به صورت تجاری در دسترس بوده و برای درمان بیماری‌های مختلف مانند دیابت و بیماری‌های التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۵].

در این مطالعه از پروتئین‌های شیر گاو به عنوان منبع پروتئینی برای استخراج پپتیدهای فعال زیستی توسط روش هضم به وسیله آنزیم‌های گوارشی انسان استفاده شد و برهمکنش آن‌ها با ۹ پروتئین هدف درمان سرطان مورد بررسی قرار گرفت. این پروتئین‌ها شامل گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۶</sup> (EGFR2)، آنزیم تیمیدین فسفوریلاز<sup>۷</sup> (TP)، آنزیم تیمیدیلات سنتاز<sup>۸</sup> (TS)، گیرنده فولات بتا<sup>۹</sup> (FOLR2) و گلايسين-آمید ريبونوكلوتيد ترانسفورمیلاز<sup>۱۰</sup> (GART)، لنفوم B سل ۲ (BCL2)، گلوکوتایون S-

<sup>1</sup>Whey proteins

<sup>2</sup> $\alpha$ -lactalbumin

<sup>3</sup> $\beta$ -lactoglobulin

<sup>4</sup>Estrogen-responsive breast cancer

<sup>5</sup>United States Food and Drug Administration

<sup>6</sup>Epidermal growth factor receptor 2

<sup>7</sup>Thymidine phosphorylase

<sup>8</sup>Thymidylate synthase

<sup>9</sup>Folate receptor beta

<sup>10</sup>Glycinamide ribonucleotide transformylase

<sup>11</sup>B-cell lymphoma 2

ترانسفراز آلفا ۱ (GSTA1)، اپوکسید هیدرولاز محلول<sup>۲</sup> (sEH) و لاکتات دهیدروژناز<sup>۳</sup> (LDHA) می‌باشند که در ادامه نقش این پروتئین‌ها در سلول و اهمیت آن‌ها در درمان سرطان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اختلال در تنظیم، جهش و بیان بیش از حد پروتئین EGFR در بسیاری از بدخیمی‌های اپی‌تلیال مشخص شده است. این پروتئین نقش مهمی در پیشرفت چرخه سلولی، رشد تومور و توسعه سرطان دارد. دو دسته از عوامل بازدارنده EGFR امروزه با هدف درمان سرطان توسعه یافته‌اند که شامل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال<sup>۴</sup> و مهارکننده‌های تیروزین کیناز<sup>۵</sup> (TKIs) می‌باشند. علیرغم موفقیت‌های اخیر در استفاده از عوامل بازدارنده EGFR، هنوز نگرانی‌هایی در مورد سمیت این عوامل و تداخل نامطلوب با شیمی‌درمانی وجود دارد، بنابراین مطالعات بیشتر در مورد مهارکننده‌های EGFR و یافتن پپتیدهای مهارکننده‌ی ایمن ضروری به نظر می‌رسد [۲۱].

تنظیم کننده‌های آنژیوژنز<sup>۶</sup> اهداف مطلوبی برای داروهای مهارکننده ضدسرطان هستند. آنزیم تیمیدین فسفریلاز (TP) یک آنزیم درون سلولی با عملکرد اصلی در رگ‌زایی است. افزایش تنظیم TP در تومورهای مختلف مشاهده شده است و فعالیت بالای این آنزیم با رشد تومور، افزایش رگ‌زایی و متاستاز همراه است [۷]. TP واکنش‌هایی را کاتالیز می‌کند که تیمین و a-2-deoxy-D-ribose-1-phosphate تولید می‌کنند. این محصولات برای اثر رگ‌زایی این آنزیم ضروری هستند [۳۱]. مهار هدفمند فعالیت کاتالیزوری TP یکی از راهبردهای مهم برای درمان سرطان است [۲۸]. در دهه گذشته، بسیاری از ترکیبات بازدارنده برای مهار TP توسعه یافته‌اند [۱].

آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS) به عنوان یک آنزیم وابسته به فولات عمل می‌کند و منبع جدیدی از ۲'-deoxythymidine-5'-triphosphate را فراهم می‌کند، بنابراین مهار TS منجر به توقف سنتز DNA به صورت *de novo* و حذف سلول‌های سرطانی می‌شود. نرخ پاسخ بازدارنده‌های فعلی TS پایین است (۳۰-۲۵٪)، و تلاش‌های زیادی برای دستیابی به مهارکننده‌های جدید TS که مؤثرتر هستند، انجام شده است [۱۰، ۳۲].

اسید فولیک (ویتامین B9) نیز برای متابولیسم سلولی اصلی مانند سنتز نوکلئوتیدها مورد نیاز است. یکی دیگر از اهداف پروتئینی انتخاب شده در این مطالعه، گیرنده فولات (FOLR2) است که اسید فولیک را برای سلول‌ها جذب می‌کند [۳]. بیان بیش از حد گیرنده فولات بتا بر روی سلول‌های سرطانی می‌تواند به طور مؤثر برای درمان هدفمند سرطان استفاده شود [۴۲].

پروتئین‌هایی که در سنتز نوکلئوتید نقش دارند می‌توانند اهداف ضد تکثیر بالقوه برای درمان سرطان باشند، زیرا نوکلئوتیدها نقش حیاتی در زنده ماندن سلول‌ها دارند. GART یک آنزیم حیاتی برای سنتز پورین در سلول‌ها است [۴].

گروه دیگری از پروتئین‌ها که گزینه‌های مطلوبی برای داروهای مهارکننده ضدسرطان هستند، عواملی هستند که در تنظیم آپوپتوز نقش دارند. یکی از پروتئین‌های اصلی در این مورد BCL2 است که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌های BCL2 ضد آپوپتوتیک هستند و بیان بیش از حد آن‌ها باعث سرطان خون و پیشرفت لنفوم می‌شود [۲۴].

اعضای خانواده گلوکوتایون S-ترانسفراز (GST) نقش مهمی در سم زدایی، متابولیسم و سرطان‌زایی دارند. ایزوآنزیم آلفا ۱ گلوکوتایون اس ترانسفراز عمدتاً در مقاومت به سیس پلاتین انواع رایج تومور جامد نقش دارد. در واقع گلوکوتایون ترانسفرازها نقش مهمی در سم زدایی سلول علیه ترکیبات مضر و همچنین استرس دارند و این ویژگی توسط سلول‌های سرطانی برای بدست آوردن مقاومت در برابر داروها و بهبود بقای آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵۴].

التهاب و نفوذ سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها فرآیندهای مهمی در پیشرفت سرطان هستند. اپوکسی هیدرولاز محلول یک آنزیم اصلی پیش التهابی است که در سلول‌های سرطانی ناشی از التهاب بیش از حد بیان می‌شود. بنابراین sHE هدف مهم و مناسبی برای داروهای مهارکننده سرطان است [۱۲].

یکی از مشخصه‌های تومورهای بدخیم استفاده از گلیکولیز به جای فسفوریلاسیون اکسیداتیو است که به آن اثر واربورگ می‌گویند. آنزیم اصلی تنظیم‌کننده این فرآیند لاکتات دهیدروژناز A است. به همین دلیل، LDHA امروزه به عنوان یک هدف مهم برای داروهای ضدسرطانی مهارکننده در نظر گرفته می‌شود [۲۶].

## مواد و روش‌ها

### شناسایی محتوای پروتئینی شیر و استخراج پپتیدهای فعال زیستی

در مطالعه حاضر، از شیر گاو به عنوان منبع پروتئینی برای استخراج پپتیدهای فعال زیستی استفاده شد. با این هدف، در مرحله اول، توالی‌های FASTA مربوط به پروتئین‌های اصلی شیر (۷ پروتئین شامل بتا کازئین، آلفا-S1-کازئین، آلفا-S2-کازئین، کاپا-کازئین، لاکتوترانسفرین، آلفا-لاکتالبومین و بتا-لاکتوگلوبولین) از پایگاه داده Uniprot (به آدرس <https://www.uniprot.org/>) به دست آمد [۳۸]. سپس برای برش پروتئین‌های مذکور و استخراج پپتیدهای فعال زیستی از آن، از سرور PeptideCutter (به آدرس [https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) استفاده شد. PeptideCutter مکان‌های بالقوه برش سوبسترا که توسط پروتئازها یا مواد شیمیایی در یک توالی پروتئینی خاص بریده می‌شوند را پیش‌بینی می‌کند [۱۷]. آنزیم‌های تریپسین، پپسین (pH 1.3) و کیموتریپسین از طریق این سرور برای برش پروتئین‌ها استفاده شد و پپتیدهایی با طول ۳-۹ اسیدآمینو برای تجزیه و تحلیل بیشتر استخراج شدند.

### پیش‌بینی ساختار پپتیدهای فعال زیستی استخراج شده و تهیه کتابخانه پپتیدی

جهت پیش‌بینی ساختار سه بعدی پپتیدها و ساخت کتابخانه‌ی پپتیدی، سرور PEP-FOLD3 (به آدرس <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>) مورد استفاده قرار گرفت. PEP-FOLD3 یک ابزار محاسباتی است که امکان پیش‌بینی ساختار سه بعدی به روش *de novo* را برای پپتیدهای خطی بین ۵ تا ۵۰ اسید آمینو فراهم می‌کند [۲۲]. از آنجایی که پیش‌بینی PEP-FOLD3 به طول توالی ۵-۵۰ اسید آمینو محدود می‌شود، نرم‌افزار Avogadro (<https://avogadro.cc/>) [۲۰] برای پیش‌گویی ساختار سه بعدی پپتیدهایی با طول ۳-۴ اسید آمینو مورد استفاده قرار گرفت.

### شناسایی و انتخاب پروتئین‌های مهم هدف درمان سرطان

پروتئین‌های اصلی درگیر در درمان سرطان، براساس وجود داروهای مهارکننده تأیید شده FDA در پایگاه Drug Bank (به آدرس <https://go.drugbank.com/>) [۴۹] و وجود ساختارهای کریستالی این پروتئین‌ها و مهارکننده‌های آن‌ها در بانک اطلاعات پروتئین (PDB، به آدرس <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>) [۶] شناسایی شدند. براساس این ویژگی‌ها، ۹ پروتئین انسانی (گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR2)، آنزیم تیمیدین فسفوریلاز (TP)، آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS)، گیرنده فولات بتا (FOLR2) و گلایسین‌آمید ریونوکلوئید ترنسفورمیلاز (GART)، لنفوم B سل 2 (BCL2)، گلوکوتایون S- ترانسفراز آلفا ۱ (GSTA1)، اپوکسید هیدرولاز محلول (SEH) و لاکتات دهیدروژناز A (LDHA)) انتخاب شدند. ساختار سه بعدی کمپلکس پروتئین‌های مذکور با داروهای مهارکننده آن‌ها از پایگاه PDB بارگیری شد. سپس، ساختار هر دارویی که در کریستال پروتئینی ذخیره شده بود بعنوان کنترل مثبت توسط نرم‌افزار Chimera1.5.3 (<http://chimera.software.informer.com/1.5/>) [۳۶] از ساختارهای کمپلکس استخراج شد و برای آنالیزهای بعد مورد استفاده قرار گرفت.

### ارزیابی داکینگ<sup>۱</sup>

تجزیه و تحلیل برهمکنش ترکیبات مهارکننده (به عنوان لیگاند) با پروتئین‌های هدف (به عنوان گیرنده) توسط نرم‌افزار Autodock4.2.6 (<http://autodock.scripps.edu/>) [۲۲] انجام شد. ADT برای تهیه لیگاندها و گیرنده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای هر لیگاند و گیرنده، تمام هیدروژن‌های قطبی اضافه شدند و بار Gasteiger محاسبه شد. سپس مولکول‌ها با فرمت PDBQT ذخیره شدند و برای بررسی داکینگ مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر گیرنده، جعبه grid بر روی محل مهار پروتئین‌ها با فاصله grid برابر  $0.375 \text{ \AA}$  در هر بعد قرار داده شد. داکینگ مولکولی توسط الگوریتم Lamarckian genetic، با در نظر گرفتن تمام پیوندهای چرخشی لیگاندها به عنوان قابل چرخش و گیرنده‌ها به صورت غیرقابل چرخش انجام شد. برای هر گیرنده و لیگاند، چندین داکینگ مستقل انجام شد و ساختارهای نهایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

### بررسی کمپلکس‌های حاصل از داکینگ

برای تجزیه و تحلیل کمپلکس‌های پروتئینی حاصل از داکینگ، از نرم‌افزارهای PyMOL1.7.2.1 (<https://pymol.org/>) [۴۰]، LigPlot4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>) [۴۵] و Chimera1.5.3 استفاده شد. انرژی اتصال هر کمپلکس محاسبه شده و برهمکنش‌های بین مولکولی توسط این نرم‌افزارها مشاهده گردید.

### غربالگری مجازی<sup>۲</sup>

غربالگری مجازی پپتیدهای فعال زیستی به دست آمده از پروتئین‌های شیر، توسط نرم‌افزار PyRx (<https://pyrx.sourceforge.io/>) [۱۱] انجام شد. غربالگری پپتیدهای هر پروتئین به صورت جداگانه انجام شد و از داروی اصلی مهارکننده پروتئین‌های هدف به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای هر اجرا، پارامترهای غربالگری با

پارامترهای مورد استفاده برای داکینگ داروهای مهارکننده و پروتئین‌ها یکسان بود. در نهایت، پپتیدهایی با انرژی اتصال منفی بیشتر در مقایسه با مهارکننده‌ها شناسایی شدند.

### ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی و ضدسرطانی پپتیدها

به منظور تجزیه و تحلیل خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدهای با انرژی اتصال منفی‌تر نسبت به مهارکننده‌های اصلی در برهمکنش با پروتئین‌های هدف، از چندین ابزار محاسباتی آنلاین به شرح زیر استفاده شد.

ابزار EMBOSS Pepstats (به آدرس [https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepstats/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)) که جهت تعیین میانگین وزن باقی‌مانده‌ها، ضرایب خاموشی مولی، بار<sup>۳</sup> و نقطه ایزوالکتریک<sup>۴</sup> پپتیدها مورد استفاده قرار گرفت. EMBOSS Pepstats پارامترهایی مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و غیره را برای پروتئین‌ها محاسبه می‌کند [۳۷]. همچنین ابزار MLCPP (به آدرس <http://www.theaglelab.org/MLCPP/>) برای پیش‌بینی قدرت نفوذپذیری سلولی<sup>۵</sup> پپتیدها استفاده شد. MLCPP یک ابزار ارزشمند برای پیش‌بینی پپتیدهای نفوذکننده به درون سلول<sup>۶</sup> (CPPs) و کارایی جذب آن‌ها است [۳۰]. LogP، LogD، LogSw، tPSA، حلالیت<sup>۷</sup> و فراهمی زیستی خوراکی<sup>۸</sup> پپتیدها نیز از طریق سرور FAFDrugs4 (به آدرس <https://fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr/links>) آنالیز شدند. FAFDrugs4 (Free ADME-Tox Filtering Tool) برنامه‌ای برای فیلتر کردن کتابخانه‌های دارویی بزرگ قبل از آزمایش‌های غربالگری یا مطالعات مدل‌سازی مرتبط است [۲۷]. آبدوستی<sup>۹</sup> پپتیدها و سمیت<sup>۱۰</sup> آن‌ها از طریق ابزار ToxinPred (به آدرس [https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi\\_submit.php](https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php)) ارزیابی شد. ToxinPred یک روش *in silico* است که برای پیش‌بینی و طراحی پپتیدهای سمی/غیرسمی توسعه یافته است [۱۹]. در نهایت، ابزار AllerTOP (به آدرس <http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/feedback.py>) برای پیش‌بینی حساسیت‌زایی<sup>۱۱</sup> پپتیدی استفاده شد. AllerTOP سروری برای پیش‌بینی آلرژن‌ها براساس ویژگی‌های اصلی فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها است [۱۳].

بررسی خاصیت ضد سرطانی پپتیدهای مورد مطالعه، از ابزار AntiCP (به آدرس <https://webs.iitd.edu.in/raghava/anticp/index.html>) استفاده شد که یک ابزار تخصصی تحت وب برای بررسی خاصیت ضدسرطانی پپتیدها می‌باشد [۲].

### مطالعات داکینگ مجدد با تکنیک Re-dock بر روی پپتیدهای منتخب

- 
- 1Average residue weight
  - 2Molar extinction coefficients
  - 3Charge
  - 4Isoelectric point
  - 5Cell-permeability strength
  - 6Cell-penetrating peptides
  - 7Solubility
  - 8Oral bioavailability
  - 9Hydrophilicity
  - 10Toxicity
  - 11Allergenicity

پس از شناسایی پپتیدهای دارای خواص فیزیوشیمیایی مطلوب، آنالیز مجدد داک با استفاده از نرم افزار AutoDock CrankPep (ADCP) (<https://ccsb.scripps.edu/adcp/>) انجام شد. ADCP یک ابزار داکینگ جدید از مجموعه AutoDock است که به طور اختصاصی برای بررسی برهمکنش پروتئین-پپتید مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵۲]. در این مرحله، کمپلکس‌های داکینگ به دست آمده از غربالگری مجازی، برای انجام مطالعات Re-dock استفاده شد. در نهایت، کمپلکس‌های بدست آمده از آنالیز داکینگ مجدد، توسط نرم‌افزارهای PyMOL1.7.2.1، LigPlot4.5.3 و Chimera1.5.3 بررسی شدند تا پاکت اتصالی پپتیدها مورد شناسایی قرار گیرد.

### شناسایی مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با پروتئین‌های هدف پپتیدهای مطلوب

به منظور شناسایی دقیق مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با پروتئین‌های هدف پپتیدهای مطلوب، از پایگاه KEGG استفاده شد. پایگاه KEGG، یک منبع ذخیره کننده نقشه‌ی مسیرهای متابولیکی مرتبط با ژن‌ها و پروتئین‌ها است. این پایگاه همچنین در بردارنده اطلاعات مسیرهای متابولیکی مرتبط با بیماری‌ها و داروهای مرتبط با آنها می‌باشد که به یکی از پرکاربردترین پایگاه‌های زیستی تبدیل شده است. برای یافت مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با پروتئین‌های مورد بررسی، از منبع KEGG pathway موجود در این پایگاه استفاده گردید. KEGG pathway مجموعه‌ای از نقشه‌های سیگنال‌رسانی است که اطلاعاتی در مورد برهم‌کنش‌های مولکولی، واکنش‌ها و شبکه‌های مرتبط با متابولیسم، پردازش اطلاعات ژنتیکی، پردازش اطلاعات محیط سلولی، فرآیندهای سلولی، سیستم‌های ارگانیسمی، بیماری‌های انسانی و توسعه دارو ارائه می‌دهد [۲۳].

### نتایج

#### استخراج پپتیدهای فعال زیستی از شیر و تهیه کتابخانه پپتیدی

برای تهیه کتابخانه پپتیدهای فعال زیستی، از ۷ پروتئین شیر استفاده شد و کدهای Uniprot این پروتئین‌ها و تعداد پپتیدهای فعال زیستی استخراج شده از هر پروتئین از طریق برش آنزیمی با سرور PeptideCutter در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس جدول ۱ تعداد ۳۳۴ پپتید از پروتئین‌های شیر استخراج شد و از بین این مجموعه، پپتیدهایی با طول ۳ الی ۹ اسیدآمینو (مجموعاً ۱۱۸ پپتید) انتخاب شدند. در مرحله بعد ساختار پپتیدها از طریق سرور PEP-FOLD3 و نرم افزار Avogradro پیش‌بینی شد. در نهایت ساختارهای پیش‌بینی شده برای تهیه کتابخانه و غربالگری مجازی مورد استفاده قرار گرفت.

#### ارزیابی روش داکینگ روی اهداف پروتئینی درمان سرطان

برای بررسی برهمکنش بین پروتئین‌های هدف درمان سرطان و مهارکننده‌های آنها، از Autodock4.2.6 استفاده شد. با این هدف، ۱۰ ساختار کریستالی از ۹ پروتئین اصلی درگیر در درمان سرطان و مهارکننده‌های آنها از پایگاه PDB به دست آمد (دو کمپلکس گیرنده فولات بتا با دو مهارکننده مختلف انتخاب شد). برای تحلیل داده‌های داکینگ، پروتئین‌های هدف به‌عنوان گیرنده و داروهای مهارکننده آنها به‌عنوان لیگاند (کنترل مثبت) مورد استفاده قرار گرفتند (به جز پروتئین‌های HER2 و

**BCL2** که پپتیدهای شناسایی شده در مطالعات داکینگ قبل یعنی **HRAP** و **LVPK** به ترتیب به‌عنوان لیگاند مورد استفاده قرار گرفتند). لیست کمپلکس‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

برای هر پروتئین و داروی مهارکننده آن، چندین داکینگ مستقل انجام شد و سپس انرژی اتصال کل و نتایج برهمکنش هر کمپلکس بررسی گردید. نتایج بهترین داکینگ برای پروتئین‌های مورد مطالعه براساس انرژی‌های اتصال و موقعیت داروهای داکینگ شده در جدول ۳ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، انرژی اتصال برای کمپلکس‌های **HER2- HRAP**، **TS-LYA**، **HTP-CMU**، **FOLR2-4DW**، **GART-4DW**، **BH3 mimetic**، **BCL2- GSTA1- LZ6**، **sEH-FVS**، **FOLR2-MTX** و **LDHA-88N** به ترتیب برابر **3.99**، **-11.32**، **-7.08**، **-13.48**، **-10.45**، **3.89**، **-6.87**، **-10.27**، **-11.36** و **-12.35** کیلوکالری برمول می‌باشند.

نتایج ساختاری تحلیل داده‌های داکینگ برای هر کمپلکس نیز در شکل ۱ نشان داده شده است. برای هر کمپلکس، برهمکنش بین پروتئین و دارو در مقایسه با ساختار کریستالی نیز نشان داده شده است. همانطور که شکل مشاهده می‌شود، برای هر مدل داکینگ شده، داروها در موقعیت یکسانی با موقعیت‌های موجود در ساختارهای کریستال می‌باشند. **RMSD** بدست آمده توسط نرم‌افزار **chimera** برای هر ساختار (جدول ۳) نیز موید صحت انجام مرحله داکینگ است. بنابراین، از همان پارامترهای تنظیم شده در داکینگ (ابعاد و مرکز گرید باکس تعریف شده) برای غربالگری کتابخانه‌های فعال زیستی استفاده شد. از آنجایی که ساختار کریستالی برای کمپلکس **HER2-HRAP** گزارش نشده است، موقعیت‌های پیشنهاد شده توسط مطالعات قبلی [۳۴] برای انتخاب بهترین موقعیت اتصال استفاده شد.

### غربالگری مجازی و شناسایی پپتیدهای فعال زیستی بالقوه درمانی

همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد، از نرم‌افزار **PyRx** برای غربالگری پپتیدهای فعال زیستی به دست آمده از پروتئین‌های شیر استفاده شد. نتایج غربالگری پپتیدهایی با انرژی اتصال منفی‌تر یا برابر با مهارکننده‌های مورد مطالعه در جدول **S1** نشان داده شده است. همانطور که دیده می‌شود، ۲۱۶ برهمکنش پروتئین-پپتید، دارای انرژی اتصال منفی‌تر یا مساوی با برهمکنش پروتئین-لیگاند اصلی بوده و برای تجزیه و تحلیل بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. این برهمکنش‌ها شامل ۲ پپتید برای پروتئین **HER2**، ۴۱ پپتید برای پروتئین **HTP**، ۱۰۴ پپتید برای پروتئین **BCL2**، ۱ پپتید برای پروتئین **LDHA**، ۶۶ پپتید برای پروتئین **GSTA1**، ۱ پپتید برای **sEH** و ۱ پپتید برای **FOLR2** می‌باشند.

### تجزیه و تحلیل خواص فیزیکوشیمیایی و خاصیت ضدسرطانی پپتیدهای مطلوب

پپتیدهای دارای انرژی اتصال منفی‌تر یا مساوی با داروهای مهارکننده (شناسایی شده از طریق غربالگری) برای ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین وزن باقی‌مانده‌ها، ضرایب خاموشی مولی، آب دوستی، آبگریزی، بار، نقطه ایزوالکتریک و قدرت نفوذپذیری سلولی این پپتیدها در جدول **S2** نشان داده شده است. **LogD**، **LogP**، **LogSw**، **tPSA**، فراهمی زیستی خوراکی، سمیت و حساسیت‌زایی پپتیدها نیز در جدول **S3** نشان داده شده است.

همانطور که در جدول **S3** دیده می‌شود، ۱۸ پپتید از شیر به عنوان پپتیدهای غیرسمی و غیرحساسیت‌زا پذیرفته شدند. همه این پپتیدها به سلول نفوذ می‌کنند و می‌توانند به عنوان داروهای بالقوه برای درمان سرطان مورد تجزیه و تحلیل بیشتر واقع شوند. همچنین در ابزار **AntiCP** تمامی این پپتیدها به عنوان پپتیدهای ضدسرطان شناسایی شدند.

## آنالیز Re-dock بهترین پپتیدها و تجزیه و تحلیل محل برهمکنش

پپتیدهای با خواص فیزیوشیمیایی مطلوب و با طول بیش از ۵ اسیدآمین به دست آمده از شیر (۱۰ پپتید) برای انجام آنالیز Re-dock مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج ساختاری آنالیز Re-dock برای هر کمپلکس پروتئین-پپتید در شکل ۲ نشان داده شده است. برای هر کمپلکس، اسیدهای آمینه درگیر در پیوند هیدروژنی و اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش‌های غیر پیوندی نیز در جدول ۴ نشان داده شده است.

### پاکت اتصال اهداف مورد مطالعه برای پپتیدهای برتر

پس از انجام آنالیزهای Re-dock، پاکت اتصال اهداف مورد مطالعه برای پپتیدهای برتر شناسایی شد. همانطور که گفته شد، ۱۰ پپتید از شیر برای آنالیز مجدد داکینگ استفاده شدند. خواص کلی این پپتیدها، که می‌توانند به عنوان داروی بالقوه برای درمان سرطان پیشنهاد شوند، در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در این جدول دیده می‌شود، تمامی این پپتیدها غیرسمی و غیرحساسیت‌زا بوده و می‌توانند به درون سلول نفوذ کنند. به طور کلی این پپتیدها، ۲ پروتئین BCL2 و GSTA1 را مورد هدف قرار می‌دهند. همچنین برخی از این پپتیدها مانند HPHPHL، AAHVK و CVPNSK به طور همزمان برای هر دو پروتئین، مهارکننده‌هایی قوی‌تر از مولکول مهارکننده اصلی هستند. لذا در ادامه مطالعه، این دو پروتئین به طور ویژه از لحاظ پاکت اتصال برای پپتیدهای شناسایی شده و نیز مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با عملکرد آن‌ها، مورد بررسی قرار داده شدند.

اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش هر پروتئین با پپتیدهای ذکر شده (پاکت‌های اتصال) در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۶ دیده می‌شود، ریشه‌های Pro123، Leu169 و Asn172 از جمله اسیدهای آمینه‌ای هستند که همواره در برهمکنش هیدروژنی و یا برهمکنش‌های غیرپیوندی میان پروتئین BCL2 و پپتیدهای مهارکننده پیشنهادی دیده می‌شوند. همچنین ریشه‌های Gly14 و Arg15 همواره در برهمکنش هیدروژنی و یا برهمکنش‌های غیرپیوندی میان پروتئین GSTA1 و پپتیدهای مهارکننده پیشنهادی دیده می‌شوند.

به طور کلی می‌توان گفت که اسیدهای آمینه در محدوده ۱۲-۳۱ و ۱۲۳-۱۷۹ از BCL2 و اسیدهای آمینه در محدوده ۸۱۵-۹۵۱ از GART، پاکت‌های اتصال برای پپتیدهای بالقوه ضدسرطان شناسایی در مطالعه حاضر شده هستند. بر اساس جدول ۳، پاکت‌های اتصال پروتئین‌های BCL2 و GSTA1 برای مهارکننده‌های اصلی آن‌ها (به ترتیب BH3 mimetic و Pemetrexed) شامل اسیدهای آمینه در محدوده ۱۲۴-۱۷۶ و ۸۹۲-۹۵۰ می‌باشند.

### مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با پروتئین‌های BCL2 و GSTA1

مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با دو پروتئین BCL2 و GSTA1 توسط پایگاه KEGG مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این بررسی برای پروتئین BCL2 در جدول ۷ و برای پروتئین GSTA1 در جدول ۸ نشان داده شده است. همانگونه که در این جداول دیده می‌شود، مسیرهای hsa01524 (مقاومت به داروهای مبتنی بر پلاتین)، hsa05200 (مسیرهای مرتبط با سرطان)، hsa05207 (سرطان‌زایی شیمیایی) و hsa05418 (مسیرهای درگیر در آترواسکلوئوزیس) مسیرهای مشترک میان

این دو پروتئین هستند. ۳ مسیر اول مرتبط با بیماری‌زایی سرطان بوده و به طور مشترک توسط پپتیدهای پیشنهاد شده در این مطالعه مورد هدف قرار داده می‌شوند.

مسیر سیگنال‌رسانی مرتبط با مقاومت به داروهای مبتنی بر پلاتین (hsa01524) در شکل ۳ نشان داده شده است. همانگونه که در این تصویر دیده می‌شود، افزایش تعداد نسخه‌های پروتئین BCL2 در غشا میتوکندری و عملکرد آن، سبب جلوگیری از وقوع آپوپتوز القا شده توسط سیس‌پلاتین می‌شود. به علاوه پروتئین‌های GST (مانند GSTA1) با متصل کردن سیس-پلاتین و داروهای مشابه آن به مولکول گلوپتایون، سبب افزایش جریان رو به خارج این دارو از طریق ناقلین غشایی (مانند ATP7A/B و MRP2) می‌گردند.

همچنین شکل ۴، نقش دو پروتئین BCL2 و GSTA1 را در مسیرهای مرتبط با سرطان (hsa05200) نشان می‌دهد. همانگونه که در این تصویر دیده می‌شود، در بیماری‌زایی سرطان، پروتئین BCL2 با فعال شدن توسط مسیر سیگنال‌رسانی mTOR می‌تواند سبب فرار سلول از آپوپتوز گردد. همچنین عملکرد مهار کننده پروتئین بر آپوپتوز القا شده توسط گیرنده Fas نیز می‌تواند به جلوگیری از وقوع آپوپتوز در سلول کمک کند. پروتئین‌های GST (مانند GSTA1) نیز در پاسخ به استرس اکسیداتیو یا استرس‌های الکتروفیلیک، فعال شده و مجدداً سبب فرار سلول از وقوع آپوپتوز می‌شوند.

با توجه به شکل ۵، می‌توان مشاهده نمود که پروتئین BCL2 فعال شده در پاسخ به مواد شیمیایی گروه ۱ (مانند نیکوتین و NNK) می‌تواند سبب مهار فرآیند آپوپتوز در سرطان‌هایی مانند سرطان ریه، سرطان مثانه و سرطان کولون شود. همچنین پروتئین‌های GST (مانند GSTA1) در پاسخ به ترکیبات شیمیایی گروه ۱ (مانند TCDD) و گروه 2B (مانند HCB) سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و می‌تواند در بیماری‌زایی سرطان‌های ریه، کبد، پوست و پستان درگیر باشند.

## بحث

مطالعه حاضر به منظور شناسایی پپتیدهای فعال زیستی حاصل از هضم آنزیمی پروتئین‌های شیر با هدف معرفی پپتیدهای درمانی جدید برای پیشگیری از سرطان انجام شد. امروزه سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در جهان است و دانشمندان در سراسر دنیا تحقیقات وسیعی برای یافتن راه‌های مهار این بیماری و درمان آن انجام می‌دهند. از جمله داروهایی که امروزه برای درمان سرطان به کار می‌رود ترکیبات شیمیایی هستند که به عنوان مهارکننده مسیرهای درگیر در سرطان عمل می‌کنند. این داروها پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی را که نقش کلیدی در رشد سلول دارند و یا در روند آپوپتوز نقش مهمی ایفا می‌کنند، هدف قرار داده و فعالیت طبیعی آن‌ها را دستخوش تغییر می‌کنند، تا به این وسیله از رشد سلول سرطانی جلوگیری کنند و یا سلول سرطانی را به سمت آپوپتوز هدایت کنند. علاوه بر ترکیبات شیمیایی، پپتیدها نیز راه خود را به میان داروهای مهارکننده سرطان باز کرده‌اند و فعالیت ضدسرطانی آن‌ها در مطالعات بسیاری مشاهده می‌شود. در این زمینه مطالعاتی نیز روی فعالیت ضد سرطانی پپتیدهای فعال زیستی حاصل از پروتئین‌های شیر صورت گرفته است. که نشان می‌دهد شیر و لبنیات حاوی ترکیبات متعدد با اثرات ضد سرطانی هستند [۴۶]. بنابراین، در این پژوهش، ۷ پروتئین از شیر انتخاب و با سه آنزیم گوارشی اصلی در دستگاه گوارش انسان شامل تریپسین، پپسین (pH=1.3) و کیموتریپسین توسط سرور PeptideCutter

هضم شدند. تریپسین و کیموتریپسین دو سرین پروتئاز پانکراس هستند و پپسین یک پروتئاز آسپارتیک است که در pH بسیار پایین (pH=1.2) عمل می‌کند و برای محیط معده بهینه شده است [۱۶].

در مجموع، ۳۳۴ پپتید از پروتئین‌های شیر به دست آمد که از بین آن‌ها، پپتیدهایی با طول ۳ تا ۹ اسیدآمینه انتخاب شدند. با هدف غربالگری مجازی پپتیدهای به دست آمده، ۹ پروتئین اصلی درگیر در درمان سرطان انتخاب شدند. مهارکننده‌های شناخته شده این پروتئین‌ها به عنوان کنترل مثبت برای تجزیه و تحلیل غربالگری استفاده شدند. نتایج غربالگری مجازی نشان داد که تعدادی از پپتیدهای بدست آمده از پروتئین‌های شیر دارای انرژی اتصال منفی‌تر یا برابر در اتصال به اهداف مورد مطالعه هستند. با این حال، از بین این پپتیدها، در مجموع ۱۸ پپتید دارای خواص فیزیوشیمیایی مناسب برای اهداف ضدسرطانی بودند. از میان این ۱۸ پپتید، پپتیدهایی با طول بیش از ۵ اسیدآمینه (۱۰ پپتید) برای آنالیز Re-dock و شناسایی پاکت اتصالی استفاده شد. در ادامه مبحث، برخی از جزئیات پاکت اتصالی برای این پپتیدها مورد بحث قرار می‌گیرد.

مطالعات داکینگ که در سال ۲۰۱۹ توسط Chen و همکاران انجام شد، نشان داده است که پپتید LPVK از سویای سیاه می‌تواند از طریق اتصال به محل فعال این پروتئین منجر به مهار BCL2 شود. براساس مطالعه ذکر شده، باقیمانده‌های Phe124A، Phe124B و Asn172B اسیدهای آمینه اصلی درگیر در برهمکنش پپتید BCL2 و LVPK بودند [۲]. همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، اسیدهای آمینه Phe124 و Asn172 از زنجیره A (که برای مطالعه حاضر استفاده شد) باقیمانده‌های اصلی درگیر در برهمکنش پروتئین BCL2 و پپتیدهای فعال زیستی مورد مطالعه بودند.

ساختار کریستالی GSTA1-Chlorambucil دو پاکت اتصالی در پروتئین GSTA1 را برای کلرامبوسیل نشان داد، شامل: (۱) پاکت اتصالی اول شامل اسیدهای آمینه Tyr9، Gly14، Arg15، Leu107، Leu108، Pro110، Val111، (۲) پاکت اتصالی دوم شامل اسیدآمینه‌های GL5، GL45، Asp101، Arg451، Arg131 و Arg131 (۴۲). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ریشه‌های آمینواسیدی مشابهی دخیل در تعامل GSTA1 با پپتیدهای ضد سرطان مورد مطالعه هستند (جدول ۴).

امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مانند غربالگری و داکینگ مولکولی کمک شایانی به شناسایی پپتیدهای فعال زیستی بالقوه درمانی نموده است. روش‌های محاسباتی از دقت بالایی برخوردارند و کاربرد وسیعی در طراحی داروهای سودمند دارند؛ بنابراین استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی از جمله دقیق‌ترین، سودمندترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌های مورد استفاده برای پژوهش‌های زیستی محسوب می‌شود. مطالعات متعددی با کمک روش‌های داکینگ مولکولی و غربالگری مجازی با هدف شناسایی پپتیدهای فعال زیستی صورت پذیرفته است که در ادامه به شرح برخی از آن‌ها می‌پردازیم.

در پژوهشی که توسط Watty و همکاران در سال ۲۰۱۷ صورت گرفت، ترکیبات فعال زیستی قارچ‌های دریایی با هدف یافت مهارکننده‌های کاربردی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، غربالگری شدند. در این مطالعه، با جمع آوری ترکیبات فعال زیستی قارچ‌های دریایی که پیش از آن منتشر شده بودند، کتابخانه‌ای متشکل از ۲۶۸ پپتید ایجاد شد. ساختار سه بعدی این پپتیدها از pubchem و chemspider بارگیری شده و ساختارهایی که موجود نبوده با برنامه MarvinSketch ساخته شدند. همچنین در این مطالعه، ساختار سه بعدی ملکول‌ها از PDB بارگیری شد و برای آنالیز و محاسبات داکینگ نیز از نرم‌افزارهای AutoDock4 و AutoDockTools استفاده شد. به علاوه نرم‌افزار PyRx به منظور غربالگری مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت از مهارکننده‌های EGFR (مورد تأیید FDA) از جمله afatinib، erlotinib.

neratinib و lapatinib، imatinib، gefitinib استفاده شد و در نهایت سه ترکیب فعال زیستی که به طور بالقوه می‌تواند مهارکننده EGFR باشند شناسایی شدند [۴۸].

در تحقیقی دیگر به منظور یافتن مهارکننده‌های جدید برای آنزیم زانتین اکسیداز، پروتئین‌های ماهی تن هیدرولیز شده و سپس غربالگری مجازی صورت گرفت. مهار این آنزیم از نقرس و هایپراوریسمی<sup>۱</sup> جلوگیری می‌کند. ابتدا به وسیله سرور PeptideCutter، با سه آنزیم پپسین، تریپسین و کیموتریپسین؛ میوزین و تروپومیوزین ماهی تن هیدرولیز شده و پپتیدهای ناشناخته سه و چهار آمینواسیدی انتخاب شدند. سپس برای بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدها مانند سمیت و حلالیت از سرورهای ToxinPred و PepCalc استفاده شد. ساختار کریستال آنزیم زانتین اکسیداز به همراه لیگاند از PDB بارگیری شده و داکینگ مولکولی با پروتکل CDOCKER نرم‌افزار DS 2017 R2 انجام گردید. در این مطالعه، کتابخانه پپتیدی دارای ۶۵ پپتید با برنامه CDOCKER غربالگری شدند و مطلوب‌ترین پپتیدها بر اساس منفی‌ترین انرژی اتصال مورد شناسایی قرار گرفتند [۵۰].

مطالعه دیگری با روش داکینگ مولکولی و غربالگری مجازی به منظور پیدا کردن پپتیدهای فعال زیستی از پروتئین‌های تخم مرغ که آنزیم آمینوپپتیداز<sup>N</sup> را مهار می‌کنند انجام شده است. این آنزیم روی سطح سلول‌هایی مانند اپیتلیوم روده و سیستم عصبی بیان می‌شود و مطالعات زیادی نشان داده‌اند که برخی بیماری‌ها مانند التهاب و سرطان با بیان بیش از اندازه این آنزیم مرتبط هستند. این آنزیم روی سطح تمام سلول‌های سرطانی بیان بیش از اندازه دارد. در این مطالعه، ابتدا هشت پروتئین تخم مرغ به وسیله سرور PeptideCutter با آنزیم‌های پپسین و تریپسین هیدرولیز شدند. سپس از سرور Peptide Ranker برای بررسی احتمال فعالیت زیستی پپتیدها استفاده شد. همچنین این پپتیدها با پپتیدهای مهارکننده آنزیم آمینوپپتیداز<sup>N</sup> که شناخته شده هستند به وسیله سرورهای BIOPEP-UWM و PepBank مقایسه شدند. برای پیش‌بینی حلالیت از سرور PepCalc استفاده شد. همچنین پپتیدها از نظر خواص ADMET بررسی شدند. در این مطالعه نیز سه پپتید فعال زیستی استخراج شده از پروتئین‌های تخم مرغ شناسایی شدند که مهارکننده آنزیم آمینوپپتیداز<sup>N</sup> هستند [۵۳].

در پژوهشی دیگر برای شناسایی یک ترکیب جدید که پتانسیل مهار پروتئین<sup>۲</sup> RBM6 را داشته باشد، از روش غربالگری مجازی استفاده شد. این پروتئین یکی از پروتئین‌های مهم به عنوان هدف در سرطان ریه انسان است. در این مطالعه چهار NSAIDs<sup>۳</sup> جدید از پایگاه داده ZINC شناسایی شد که در پاکت اتصال به خوبی داک شدند. پایگاه داده ZINC مجموعه‌ای متشکل از ترکیبات تجاری موجود است که مخصوصاً برای غربالگری مجازی تهیه شده است. در این تحقیق ۶۶۷ ترکیب NSAIDs که شباهت ۶۰ درصد به بالا با داروی کنترل مثبت آزمایش یعنی پیروکسیکام<sup>۴</sup> داشتند انتخاب و معرفی شدند [۳۳].

در پژوهشی که در سال ۱۴۰۱ توسط مهدیونی و همکاران انجام شد، کتابخانه‌های دریافت شده از پایگاه ZINC به منظور شناسایی ترکیبات بالقوه مهارکننده کمپلکس<sup>۵</sup> FOXM1 و DNA به روش غربالگری مجازی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه کتابخانه‌ها (که حدود ۲۶۰,۰۰۰ ترکیب بودند) ابتدا با استفاده از وب سرور FAF-Drugs4 بر اساس خواص

Hyperuricemia

RNA-binding motif 6

non-steroidal anti inflammatory drugs

Piroxicum

Forkhead box protein M1

فیزیکوشیمیایی غربال شدند. پس از آن، ترکیبات منتخب با استفاده از AutoDock VINA علیه پاکت های پیش‌بینی شده FOXM1 داک شدند. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی ۳ ترکیب بالقوه مهارکننده کمپلکس FOXM1-DNA گردید [۲۹].

همانگونه که اشاره شد، پپتیدهای پیشنهاد شده در این مطالعه، دو پروتئین BCL2 و GSTA1 را هدف قرار می‌دهند. به منظور درک دقیق‌تر مسیرهای سیگنال‌رسانی و فرآیندهای سلولی مرتبط با مهار این دو پروتئین در سلول سرطانی، از پایگاه KEGG استفاده شد. نتایج نشان داد که این دو پروتئین مسیرهای مرتبط با سرطان‌زایی، مقاومت به داروهای مبتنی بر پلاتین و سرطان‌زایی شیمیایی را به طور مشترک هدایت می‌کنند. بررسی این مسیر سیگنال‌رسانی نشان داد که فرآیند غالب در این سه مسیر، فرار سلول سرطانی از وقوع آپوپتوز است. نقش این دو پروتئین در ایجاد مقاومت به داروهای مبتنی بر پلاتین، فرار از آپوپتوز و نیز سرطان‌زایی شیمیایی در مطالعات مختلف نشان داده شده است. برای مثال Beale و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که افزایش بیان پروتئین BCL2، سبب ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین در سلول‌های سرطانی تخمدان (رده‌ی A2780) می‌شود [۵]. همچنین Danyelle و همکاران در سال ۲۰۰۹ عنوان کردند که بالا بودن سطح پروتئین‌های GST (مانند GSTA1) در سلول، سبب مقاومت به سیس‌پلاتین می‌گردد، چراکه این پروتئین‌ها سبب اتصال داروی سیس‌پلاتین به گلوپتایون و خروج آن از سلول می‌گردند [۴۴].

بررسی‌ها نشان داده است که افزایش بیان پروتئین BCL2 به روش‌های مختلف (مانند جایجایی کروموزومی، افزایش نسخه‌های ژنی، افزایش بیان و یا ترجمه پروتئین و افزایش پایداری آن) در بسیاری از سلول‌های سرطانی دیده شده است و این امر سبب فرار سلول سرطانی از آپوپتوز و مقاومت به درمان می‌شود [۸]. Dong و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۸ عنوان کردند که پروتئین‌های GST از طریق دو مکانیسم سبب مقاومت دارویی و مهار آپوپتوز در سلول سرطانی می‌شوند: ۱. ضعف کردن داروها از طریق خارج نمودن آن‌ها از سلول، ۲. جلوگیری از وقوع آپوپتوز با مهار مسیر MAPK [۱۴]. به طور کلی پروتئین‌های GST با سم‌زدایی داروهای شیمی‌درمانی، سبب مقاومت سلول‌های سرطانی به درمان می‌شوند [۴۳].

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه بیوانفورماتیک، پپتیدهای جدا شده از شیر توانایی بالقوه‌ای را برای مهار پروتئین‌های توصیف شده نشان دادند. امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مانند غربالگری و داکینگ‌مولکولی کمک شایانی به کشف و طراحی داروهای جدید نموده است. در سال‌های اخیر جهش بزرگی در اطلاعات ساختار پروتئین و لیگاند وجود داشته است. این اطلاعات منجر به افزایش تعداد پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیکی گردیده و این امر با هدف مدیریت و پردازش اطلاعات موجود انجام شده است. استفاده بهینه از این طیف وسیع از این ابزارهای محاسباتی، برای کشف و طراحی داروهای جدید بسیار با اهمیت است [۱۸]. پپتیدهای زیستی ضد سرطان یک جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی هستند زیرا هیچ عوارض جانبی ندارند یا عوارض جانبی بسیار کمی دارند و علاوه بر این هزینه تولید نسبتاً ارزان‌تری دارند. در این پژوهش، ۱۰ پپتید ضد سرطانی شناسایی شده در مطالعه حاضر، از روش بازدارنده‌های اصلی برای اتصال اهداف مورد مطالعه تقلید می‌کنند، زیرا نتایج نشان‌دهنده تقریباً یک بسته اتصال برای پپتیدهای شناسایی شده و مهارکننده‌های شناخته‌شده است. با این

حال، این پپتیدها در اتصال به پروتئین‌های مذکور دارای انرژی‌های اتصال منفی یا مساوی هستند که ممکن است در کنار خاصیت سمیت کمتر، منجر به اثرات بازدارندگی قوی‌تر یا حداقل برابر آن‌ها شود. همانگونه که اشاره شد، این پپتیدها با مهار پروتئین‌های **BCL2** و **GSTA1** می‌توانند سبب جلوگیری از فرآیندهای مرتبط با سرطان گردند. قابل ذکر است که فرآیند غالب در مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با این دو پروتئین، فرار از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا همان آپوپتوز است که می‌تواند به طور ویژه توسط مهارکننده‌های پیشنهاد شده در این مطالعه مورد هدف واقع شود. از مهارکننده‌های ذکر شده همچنین می‌توان در جهت جلوگیری از مقاومت دارویی به داروهای مبتنی بر پلاتین و نیز جلوگیری از وقوع سرطان‌هایی مانند سرطان ریه، مثانه، کولون، کبد، پوست و پستان در پاسخ به ترکیبات شیمیایی فعال استفاده نمود.

همچنین قابل توجه است که از میان ۱۰ پپتید نهایی، پپتیدهای **HPHPL**، **AAHVK** و **CVPNSK** می‌توانند به طور همزمان هر دو پروتئین **BCL2** و **GSTA1** را هدف قرار دهند. بنابراین نسبت به سایر پپتیدهای شناخته شده می‌توانند در اولویت بررسی‌های بعد قرار گیرند. همچنین با توجه به اینکه انرژی اتصال پپتید **HPHPL** در اتصال به دو پروتئین مذکور در مقایسه با سایر پپتیدها منفی‌تر می‌باشد (جدول ۵) این پپتید می‌تواند از میان پپتیدهای نهایی به طور شاخص‌تر مورد بررسی قرار گیرد. در گام بعد از کشف و شناسایی پپتیدهای فعال زیستی بعنوان هسته اولیه ملکول دارویی، تکنیک‌هایی مثل بهینه‌سازی فعالیت و همچنین دستکاری شیمیایی پپتیدهای طراحی شده می‌تواند صورت پذیرد. همچنین در گام انتهایی و تکمیلی مطالعات *in vivo* و *in vitro* برای اثبات این اثرات مهم پپتیدهای زیستی شیر در آینده مورد نیاز خواهد بود.

## منابع

- Ackland, S.P., and Peters, G.J. (1999). Thymidine phosphorylase: its role in sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Drug resistance updates* 2, 205-214.
- Agrawal, P., Bhagat, D., Mahalwal, M., Sharma, N., and Raghava, G.P. (2021). AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. *Briefings in bioinformatics* 22, bbaa153.
- Assaraf, Y.G., Leamon, C.P., and Reddy, J.A. (2014). The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resistance Updates* 17, 89-95.
- Batool, S., Nawaz, M.S., Mushtaq, G., Parvaiz, F., and Kamal, M.A. (2017). In silico analysis of glycinamide ribonucleotide transformylase inhibition by PY873, PY899 and DIA. *Saudi journal of biological sciences* 24, 1155-1161.
- Beale, P., Rogers, P., Boxall, F., Sharp, S., and Kelland, L. (2000). BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *British journal of cancer* 82, 436-440.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research* 28, 235-242.
- Bronckaers, A., Gago, F., Balzarini, J., and Liekens, S. (2009). The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Medicinal research reviews* 29, 903-953.
- Campbell, K.J., and Tait, S.W. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open biology* 8, 180002.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., and Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed research international* 2014.
- Chu, E., Callender, M.A., Farrell, M.P., and Schmitz, J.C. (2003). Thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents: from bench to bedside. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 52, 80-89.
- Dallakyan, S., and Olson, A.J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Chemical biology: methods and protocols*, 243-250.
- Das Mahapatra, A., Choubey, R., and Datta, B. (2020). Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors in multitarget and combination therapies for inflammation and cancer. *Molecules* 25, 5488.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D.R., and Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of molecular modeling* 20, 1-6.
- Dong, S.-C., Sha, H.-H., Xu, X.-Y., Hu, T.-M., Lou, R., Li, H., Wu, J.-Z., Dan, C., and Feng, J. (2018). Glutathione S-transferase  $\pi$ : a potential role in antitumor therapy. *Drug design, development and therapy*, 3535-3547.
- Du, Z., and Li, Y. (2022). Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100353.
- Fu, Z., Akula, S., Thorpe, M., and Hellman, L. (2021). Marked difference in efficiency of the digestive enzymes pepsin, trypsin, chymotrypsin, and pancreatic elastase to cleave tightly folded proteins. *Biological Chemistry* 402, 861-867.

17. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, (Springer).
18. Gore, M., and Jagtap, U.B. (2018). Computational drug discovery and design, (Springer).
19. Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Consortium, O.S.D.D., and Raghava, G.P. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS one* 8, e73957.
20. Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., and Hutchison, G.R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics* 4, 1-17.
21. Harari, P. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-related cancer* 11, 689-708.
22. Huey, R., Morris, G.M., and Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory 10550, 1000.
23. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., and Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research* 51, D587-D592.
24. Kapoor, I., Bodo, J., Hill, B.T., Hsi, E.D., and Almasan, A. (2020). Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance. *Cell death & disease* 11, 941.
25. Kharazmi-khorassani, J., and Asoodeh, A. (2022). The use of anticancer and cell-penetrating peptides in the treatment of cancer. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 35, 183-197.
26. Kim, E.-Y., Chung, T.-W., Han, C.W., Park, S.Y., Park, K.H., Jang, S.B., and Ha, K.-T. (2019). A novel lactate dehydrogenase inhibitor, 1-(phenylseleno)-4-(trifluoromethyl) benzene, suppresses tumor growth through apoptotic cell death. *Scientific reports* 9, 3969.
27. Lagorce, D., Bouslama, L., Becot, J., Miteva, M.A., and Villoutreix, B.O. (2017). FAF-Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics* 33, 3658-3660.
28. Liekens, S., Hernández, A.-I., Ribatti, D., De Clercq, E., Camarasa, M.-J., Pérez-Pérez, M.a.-J.s., and Balzarini, J. (2004). The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29598-29605.
29. Mahduni, H., and Merati, T. (2022). Hightroughput structure-based virtual screening to select new inhibitory chemical compound (s) against FOXM1 transcription factor with its DNA target. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 35, 198-211.
30. Manavalan, B., Subramaniyam, S., Shin, T.H., Kim, M.O., and Lee, G. (2018). Machine-learning-based prediction of cell-penetrating peptides and their uptake efficiency with improved accuracy. *Journal of proteome research* 17, 2715-2726.
31. Miyadera, K., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Yoshida, H., Konstanty, W., Yamada, Y., and Akiyama, S.-i. (1995). Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer research* 55, 1687-1690.
32. Mori, R., Yoshida, K., Futamura, M., Suetsugu, T., Shizu, K., Tanahashi, T., Tanaka, Y., Matsuhashi, N., and Yamaguchi, K. (2019). The inhibition of thymidine phosphorylase can reverse acquired 5FU-resistance in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 22, 497-505.
33. Munichandrababu, T., Bhaskar, B.V., Ravi, S., Bhuvaneshwar, C., and Rajendra, W. (2013). Structure based virtual screening of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) against RNA-binding motif 6 (RBM6) involved in human lung cancer. *Medicinal Chemistry Research* 22, 2828-2839.
34. Nakajima, H., Mizuta, N., Sakaguchi, K., Fujiwara, I., Yoshimori, A., Takahashi, S., Takasawa, R., and Tanuma, S.-i. (2008). Development of HER2-antagonistic peptides as novel anti-breast cancer drugs by in silico methods. *Breast cancer* 15, 65-72.
35. Parodi, P. (2007). A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Current pharmaceutical design* 13, 813-828.
36. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25, 1605-1612.
37. Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in genetics* 16, 276-277.
38. Ruch, P., Teodoro, D., and Consortium, U. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*.
39. Sánchez, A., and Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* 1, 29-46.
40. Seeliger, D., and de Groot, B.L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design* 24, 417-422.
41. Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., and Tufarelli, V. (2014). Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. *Molecular biology reports* 41, 1035-1048.
42. Shen, J., Putt, K.S., Visscher, D.W., Murphy, L., Cohen, C., Singhal, S., Sandusky, G., Feng, Y., Dimitrov, D.S., and Low, P.S. (2015). Assessment of folate receptor- $\beta$  expression in human neoplastic tissues. *Oncotarget* 6, 14700.
43. Singh, R.R., and Reindl, K.M. (2021). Glutathione S-transferases in cancer. *Antioxidants* 10, 701.
44. Townsend, D.M., Tew, K.D., He, L., King, J.B., and Hanigan, M.H. (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63, 79-85.

45. Wallace, A.C., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering, design and selection* 8, 127-134.
46. Wang, L., Dong, C., Li, X., Han, W., and Su, X. (2017). Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources. *Oncology reports* 38, 637-651.
47. Watty, M., Syahdi, R.R., and Yanuar, A. (2017). Database compilation and virtual screening of secondary metabolites derived from marine fungi as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Asian J. Pharm. Clin. Res* 10, 142-147.
48. Watty, M., Syahdi, R.R., and Yanuar, A. (2017). Database compilation and virtual screening of secondary metabolites derived from marine fungi as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Asian J Pharm Clin Res* 10, 142-147.
49. Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., and Hassanali, M. (2008). DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic acids research* 36, D901-D906.
50. Yu, Z., Kan, R., Wu, S., Guo, H., Zhao, W., Ding, L., Zheng, F., and Liu, J. (2020). Xanthine oxidase inhibitory peptides derived from tuna protein: virtual screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
51. Yu, Z., Kan, R., Wu, S., Guo, H., Zhao, W., Ding, L., Zheng, F., and Liu, J. (2021). Xanthine oxidase inhibitory peptides derived from tuna protein: virtual screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101, 1349-1354.
52. Zhang, Y., and Sanner, M.F. (2019). AutoDock CrankPep: combining folding and docking to predict protein-peptide complexes. *Bioinformatics* 35, 5121-5127.
53. Zhao, W., Zhang, D., Yu, Z., Ding, L., and Liu, J. (2020). Aminopeptidase N inhibitory peptides derived from hen eggs: Virtual screening, inhibitory activity, and action mechanisms. *Food Bioscience* 37, 100703.
54. Zou, M., Hu, X., Xu, B., Tong, T., Jing, Y., Xi, L., Zhou, W., Lu, J., Wang, X., and Yang, X. (2019). Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer. *Oncology Reports* 41, 989-998.

## جدول‌ها

جدول ۱. کدهای Uniprot پروتئین‌های شیر و تعداد پپتیدهای فعال زیستی استخراج شده از هر پروتئین از طریق برش آنزیمی توسط سرور PeptideCutter

نام پروتئین	کد Uniprot	تعداد پپتیدهای استخراج شده	تعداد پپتیدهای دارای ۳ الی ۹ اسید آمینه
بتا کازئین	P02666	34	20
آلفا-S1-کازئین	P02662	34	20
آلفا-S2-کازئین	P02663	44	23
کاپا-کازئین	P02668	27	16
لاکتوترانسفرین	P24627	136	85
آلفا-لاکتالبومین	P00711	25	17
بتا-لاکتوگلوبولین	P02754	34	19

جدول ۲. فهرست کمپلکس‌های PDB مورد استفاده در مطالعه. برای آنالیز داکینگ، پروتئین‌های هدف به‌عنوان گیرنده و داروهای مهارکننده آن‌ها به‌عنوان لیگاند مورد استفاده قرار گرفتند (به‌جز پروتئین‌های HER2 و BCL2 که پپتیدهای HRAP و LVPK به ترتیب به‌عنوان لیگاند استفاده شده‌اند).

نام پروتئین	نام مهارکننده
-------------	---------------

Pertuzumab Fab light chain	گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR2/HER2)	1S78
LY231514 (LYA)	آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS)	1JU6
CMU	آنزیم تیمیدین فسفوریلاز (TP)	1UOU
Pemetrexed (4DW)	گیرنده فولات بتا (FOLR2)	4KN2
Pemetrexed (4DW)	گلايسين آميد ريبنوكلئوتيد ترنسفورمياز (GART)	4ZZ3
BH3 mimetic	لنفوم B سل 2 (BCL2)	2XA0
Chlorambucil (LZ6)	گلوکوتایون S- ترانسفراز آلفا ۱ (GSTA1)	4HJ2
Fulvestrant (FVS)	اپوکسید هیدرولاز محلول (SEH)	4J03
Antifolate methotrexate (MTX)	گیرنده فولات بتا (FOLR2)	4KN0
88N	لاکتات دهیدروژناز A (LDHA)	4AJP

جدول ۳. نتایج بهترین داکینگ برای پروتئین‌های مورد مطالعه بر اساس انرژی‌های اتصال و موقعیت داروهای داک شده.

اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی	اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی	RMSD (calculated with chimera)	انرژی اتصال (kcal/mol)	ابعاد گرید (X, Y, Z)	نام کمپلکس
Glu258, Ser259, Leu295, Asn297, Lys311, Cys312, Ser313, Lys314, Pro315, Cys316	His296	---	-3.99	62, 58, 58	HER2-HRAP
Val79, Ile108, Leu221, Gly222, Phe225, Tyr258, Met311	Lys77, Phe80, Asn112, Asp218, Ala312	0.000	-11.32	58, 58, 52	TS-LYA
Thr118, Arg146, Leu148, Thr151, Gly152	His116, Ser117, Arg202, Ser217, Lys221	0.000	-7.08	90, 60, 64	HTP-CMU
Tyr76, Phe78, Tyr101, Gln116, Trp150, Arg152, Trp154, Trp187, Ser190,	Asp97, Thr98, Trp118, His151, Gly153, Trp156	0.000	-13.48	74, 70, 78	FOLR2-4DW
Leu892, Phe895, Leu899, Val904, Asn913, Val946, Glu948, Val950	Met896, Arg897, Ile898, Ala947, Asp951	0.000	-10.45	70, 70, 74	GART-4DW
Thr125, Gly128, Leu169, Asp171, Leu175, Trp176	Phe124, Arg127, Asn172	---	-3.89	50, 48, 50	BCL2- BH3 mimetic
Tyr9, Phe10, Arg15, Leu41, Gln53, Gln67, Ala216, Arg217, Phe220	Val55, Arg45, Gln54, Thr68, Asp101		-6.87	60, 60, 60	GSTA1-LZ6

			0.000			
Phe267, Pro268, Met310, Asp335, Trp336, Met339, Tyr343, Pro371, Phe381, Tyr383, Gln384, Phe387, Leu408, Met469, Tyr466, Asn472, Leu499, Trp525, His534	Ser374		0.000	-10.27	56, 56, 56	sEH-FVS
Gly153, Arg152, Trp150, Trp187, Tyr101, Tyr76, Phe78	Asp97, Thr98, Gln116, Trp118, His151, Trp154, Trp156,		0.000	-11.36	68, 72, 72	FOLR2-MTX
Gly26, Gly28, Val25, Val52, Ala95, Ala97, Arg98, Gln99, Ile115, Phe118, Ile119, Val135, Ser136, Asn137, Ala237, Ile241, Thr247	Asp51, Thr94, Gly96, Arg105, Asp140, Asp165, His192,		0.000	-12.35	70, 70, 80	LDHA-88N

جدول ۴. اسیدآمینوهای درگیر در پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های غیرپیوندی در کمپلکس‌های حاصل از آنالیز Re-dock.

اسیدآمینوهای درگیر در برهمکنش‌های غیرپیوندی	اسیدآمینوهای درگیر در پیوندهای هیدروژنی	نام کمپلکس (پروتئین-پیتید)
Arg13, Gly14, Glu17, Thr68, Leu72, Ala100, Gly103, Glu104, Ile106, Leu107	Arg15, Gln67, Arg69, Glu97, Asp101	AMKPW-GSTA1
Thr125, Ala126, Leu169, Leu175	Pro123, Phe124, Arg127, Gly128, Asp171, Asn172, Trp176	TEEEK-BCL2
Ala126, Pro123, Leu169, Asp171, Leu175	Arg127, Asn172, Trp176, Glu179	HPHPhL-BCL2
Phe10, Arg13, Gln54, Val55, Leu107, Leu108, Leu109, Pro110, Val111, Met208, Leu213, Arg217, Phe220	Tyr9, Gly14, Arg15, Ala216	HPHPhL-GSTA1
Ser18, Thr68, Gly103, Lue107, Pro110, His159, Glu162, Tyr166, Pro207	Arg15, Arg69, Asp101, Ile106, Met208	SNTVPAK-GSTA1

Arg12, Met16, Trp30, Asp31, Pro168, Ala174, Leu175, Trp176	Asp171, Asn172	AAHVK-BCL2
Tyr9, Phe10, Gly14, Gln54, Val55, Pro56, Val66, Thr68, Leu107, Met208, Arg217	Arg15, Gln67, Asp101, Phe220	AAHVK-GSTA1
Pro123, Phe124, Met166, Pro168, Leu169, Asn172	Glu165	AIAEK-BCL2
Pro123, Met166, Ser167, Pro168, Leu169, Asn172	Phe124, Glu165, Asp171	AVAVVK-BCL2
Pro123, Phe124, Glu165, Met166, Ser167, Pro168, Leu169	Arg164	CVPNSK-BCL2
Tyr9, Phe10, Gly14, Arg15, Leu108, Pro110, Val111, Met208, Leu213	Lys6, Gln54, Glu59, Glu104, Leu107	CVPNSK-GSTA1
Phe124, Thr125, Ala126, Met166, Leu175	Pro123, Arg127, Leu169, Asn172, Trp176	NIPMG-BCL2
Phe124, Leu169, Pro168	Pro123, Arg127, Asp171, Asn172, Trp176	SVDGK-BCL2

جدول ۵. ویژگی های کلی پپتیدهای پیشنهاد شده در این مطالعه به عنوان داروهای ضدسرطان.

توالی پپتید	نام پروتئین هدف	پپتید (انرژی اتصال لیگاند اصلی)	وزن میانگین باقی مانده ها (g/mol)	نقطه ایزوالکتریک بار	قدرت نفوذپذیری سلولی	LogP	LogD	LogSw	tPSA	Oral_Bioavailability_EGAN	احتمال سمی بودن	حساسیت- زایی	نتیجه نهایی
AMKPW	GSTA1	-6.8 (-6.87)	631.79	1	CPP	-1.93	-6.91	-1.49	244.11	پایین	غیر سمی	احتمالا غیر حساسیت زا	مورد قبول
TEEEK	BCL2	-4.7 (-3.89)	634.64	-2	CPP	-8.68	-17.13	3.21	352.43	پایین	غیر سمی	احتمالا غیر حساسیت زا	مورد قبول
HPHPL	BCL2-GSTA1	-4.9 (-3.89)/ -7.3 (-6.87)	736.83	1.5	CPP	-3.04	-6.3	-1.48	281.73	پایین	غیر سمی	احتمالا غیر حساسیت زا	مورد قبول
SNTVPAK	GSTA1	-7.3 (-6.87)	715.80	1	CPP	-6.67	-9.31	1.31	344.77	پایین	غیر سمی	احتمالا غیر حساسیت زا	مورد قبول
AAHVK	BCL2-GSTA1	-4.9 (-3.89)/ -7 (-6.87)	524.62	1.5	CPP	-3.52	-6.25	0.13	240.49	پایین	غیر سمی	احتمالا غیر حساسیت زا	مورد قبول

مورد قبول	احتمالا غیر حساسیت زا	غیر رسمی	پایین	251.94	1.94	-7.98	-6.16	CPP	5.8613	0	530.62	-4.9 (- 3.89)	BCL2	AIAEK
مورد قبول	احتمالا غیر حساسیت زا	غیر رسمی	پایین	240.91	-1.27	-4.53	-1.61	CPP	9.1500	1	585.74	-4.9 (- 3.89)	BCL2	AVAVVK
مورد قبول	احتمالا غیر حساسیت زا	غیر رسمی	پایین	334.24	2.19	-8.25	-7.59	CPP	7.9981	1	646.76	-4.9 (- 3.89)/ -7 (- 6.87)	BCL2- GSTA1	CVPNSK
مورد قبول	احتمالا غیر حساسیت زا	غیر رسمی	پایین	242.15	1.24	-6.04	-5.37	CPP	5.5500	0	530.64	-4.9 (- 3.89)	BCL2	NIPMG
مورد قبول	احتمالا غیر حساسیت زا	غیر رسمی	پایین	272.17	3.12	-10.4	-7.88	CPP	5.7899	0	504.54	-4.9 (- 3.89)	BCL2	SVDGK

جدول ۶. اسید آمینه های درگیر در پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های غیر پیوندی پروتئین های هدف درمان سرطان با پپتیدهای ضد سرطان پیشنهاد شده در این مطالعه.

نام پروتئین	اسید آمینه های درگیر در پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های غیر پیوندی
	Arg12, Met16, Trp30, Asp31, Pro123, Phe124, Thr125, Ala126, Arg127, Gly128, Arg164, Glu165, Met166, BCL2 Ser167, Pro168, Leu169, Asp171, Asn172, Ala174, Leu175, Trp176, Glu179

---

Lys6, Tyr9, Phe10, Gly14, Arg15, Ser18, Gln54, Val55, Pro56, Glu59, Val66, Gln67, Thr68, Arg69, Glu97, GSTA1  
Ala100, Asp101, Gly103, Glu104, Met105, Ile106, Leu107, Leu108, His159, Glu162, Tyr166, Pro110, Val111,  
Pro207, Leu213, Ala216, Arg217, Met208, Phe220

---

Preproof Article

جدول ۷. مسیرهای سیگنال‌رسانی پیشنهاد شده توسط پایگاه KEGG برای پروتئین BCL2.

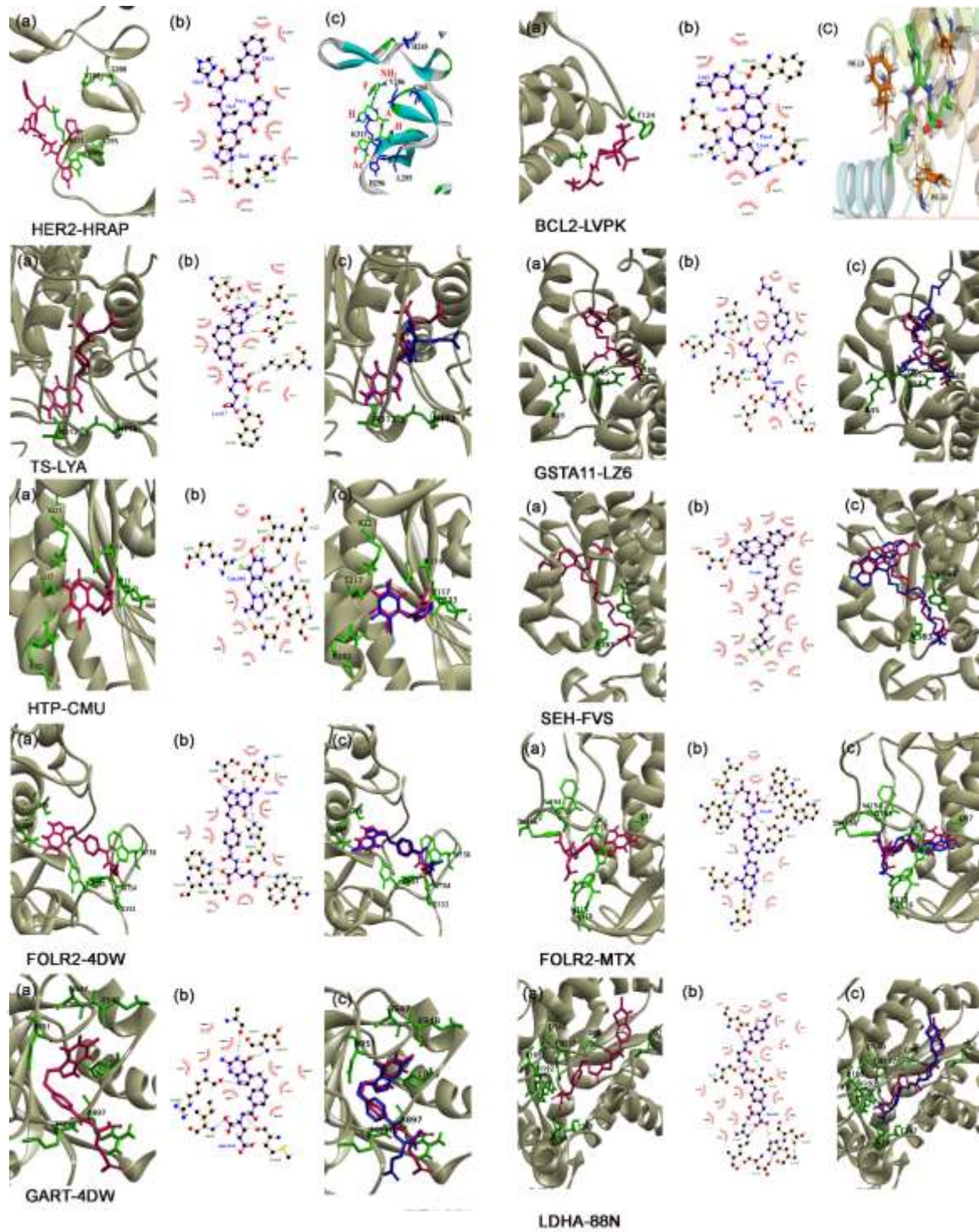
تعریف مسیر	کد شناسایی مسیر
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance - Homo sapiens (human)	hsa01521
Endocrine resistance - Homo sapiens (human)	hsa01522
<b>Platinum drug resistance - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa01524</b>
NF-kappa B signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04064
HIF-1 signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04066
Sphingolipid signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04071
p53 signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04115
Autophagy - animal - Homo sapiens (human)	hsa04140
Protein processing in endoplasmic reticulum - Homo sapiens (human)	hsa04141
PI3K-Akt signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04151
Apoptosis - Homo sapiens (human)	hsa04210
Apoptosis - multiple species - Homo sapiens (human)	hsa04215
Necroptosis - Homo sapiens (human)	hsa04217
Adrenergic signaling in cardiomyocytes - Homo sapiens (human)	hsa04261
Hedgehog signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04340
Focal adhesion - Homo sapiens (human)	hsa04510
NOD-like receptor signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04621
JAK-STAT signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04630
Neurotrophin signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04722
Cholinergic synapse - Homo sapiens (human)	hsa04725
Estrogen signaling pathway - Homo sapiens (human)	hsa04915
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action - Homo sapiens (human)	hsa04928
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - Homo sapiens (human)	hsa04933
Amyotrophic lateral sclerosis - Homo sapiens (human)	hsa05014
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases - Homo sapiens (human)	hsa05022
Shigellosis - Homo sapiens (human)	hsa05131
Salmonella infection - Homo sapiens (human)	hsa05132
Toxoplasmosis - Homo sapiens (human)	hsa05145
Tuberculosis - Homo sapiens (human)	hsa05152
Hepatitis B - Homo sapiens (human)	hsa05161
Measles - Homo sapiens (human)	hsa05162
Herpes simplex virus 1 infection - Homo sapiens (human)	hsa05168

Epstein-Barr virus infection - Homo sapiens (human)	hsa05169
Human immunodeficiency virus 1 infection - Homo sapiens (human)	hsa05170
<b>Pathways in cancer - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05200</b>
MicroRNAs in cancer - Homo sapiens (human)	hsa05206
<b>Chemical carcinogenesis - receptor activation - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05207</b>
Colorectal cancer - Homo sapiens (human)	hsa05210
Prostate cancer - Homo sapiens (human)	hsa05215
Small cell lung cancer - Homo sapiens (human)	hsa05222
Gastric cancer - Homo sapiens (human)	hsa05226
Lipid and atherosclerosis - Homo sapiens (human)	hsa05417
<b>Fluid shear stress and atherosclerosis - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05418</b>

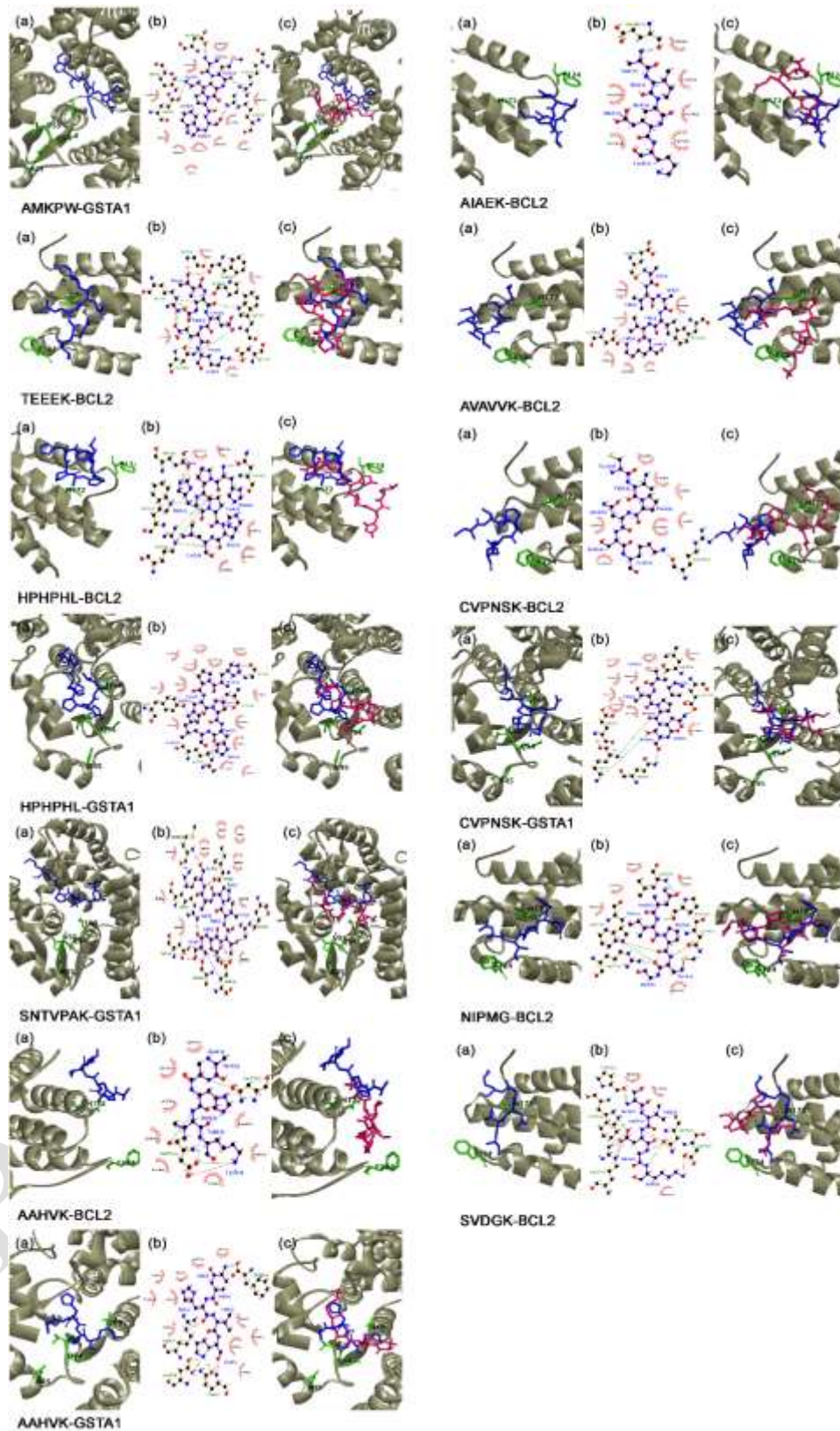
جدول ۸. مسیرهای سیگنال‌رسانی پیشنهاد شده توسط پایگاه KEGG برای پروتئین GSTA1.

تعریف مسیر	کد شناسایی مسیر
Glutathione metabolism Homo sapiens (human)	hsa00480
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 - Homo sapiens (human)	hsa00980
Drug metabolism - cytochrome P450 - Homo sapiens (human)	hsa00982
Drug metabolism - other enzymes - Homo sapiens (human)	hsa00983
Metabolic pathways - Homo sapiens (human)	hsa01100
<b>Platinum drug resistance - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa01524</b>
<b>Pathways in cancer - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05200</b>
Chemical carcinogenesis - DNA adducts - Homo sapiens (human)	hsa05204
<b>Chemical carcinogenesis - receptor activation - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05207</b>
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species - Homo sapiens (human)	hsa05208
Hepatocellular carcinoma - Homo sapiens (human)	hsa05225
<b>Fluid shear stress and atherosclerosis - Homo sapiens (human)</b>	<b>hsa05418</b>

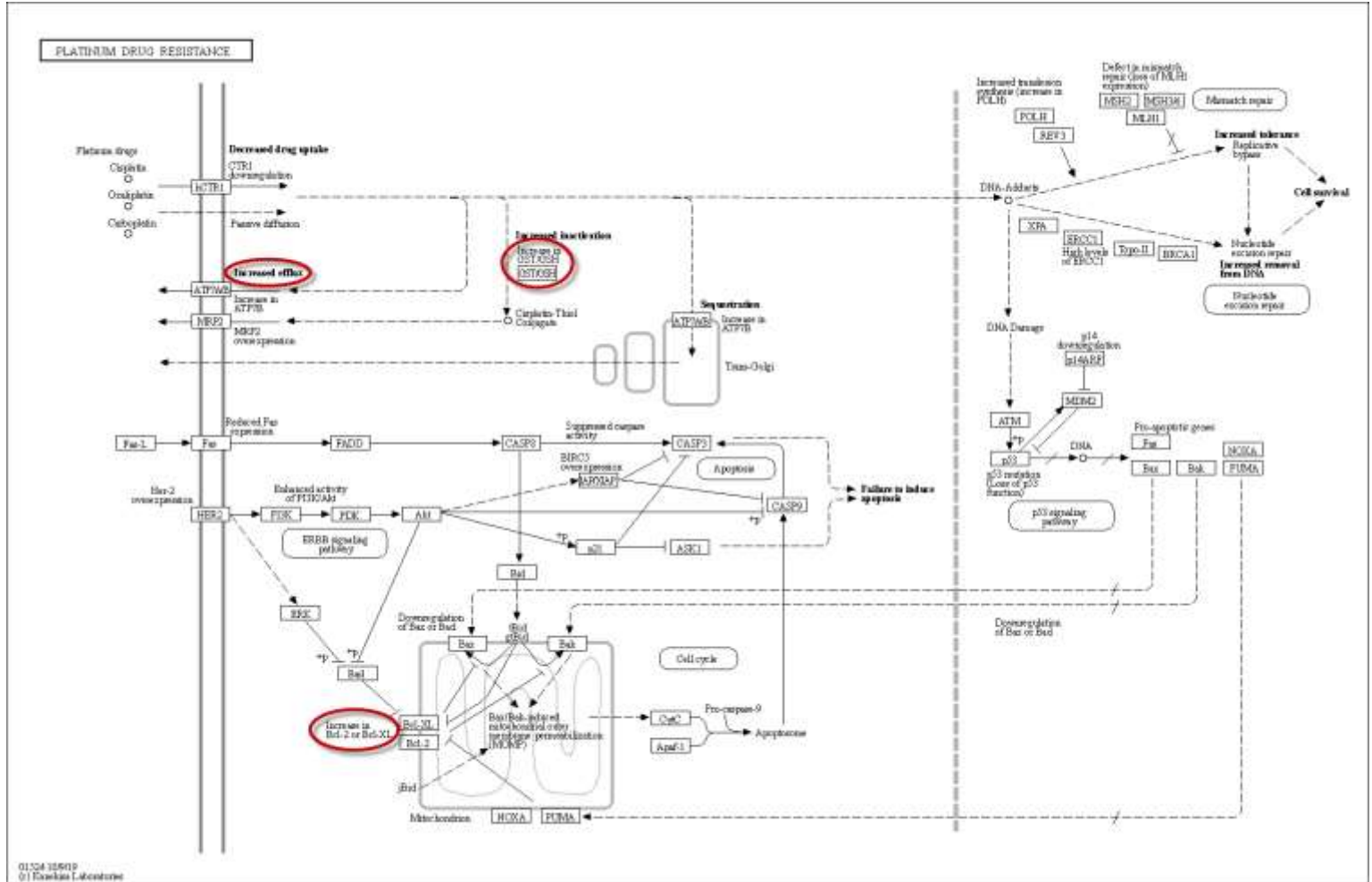
تصاویر



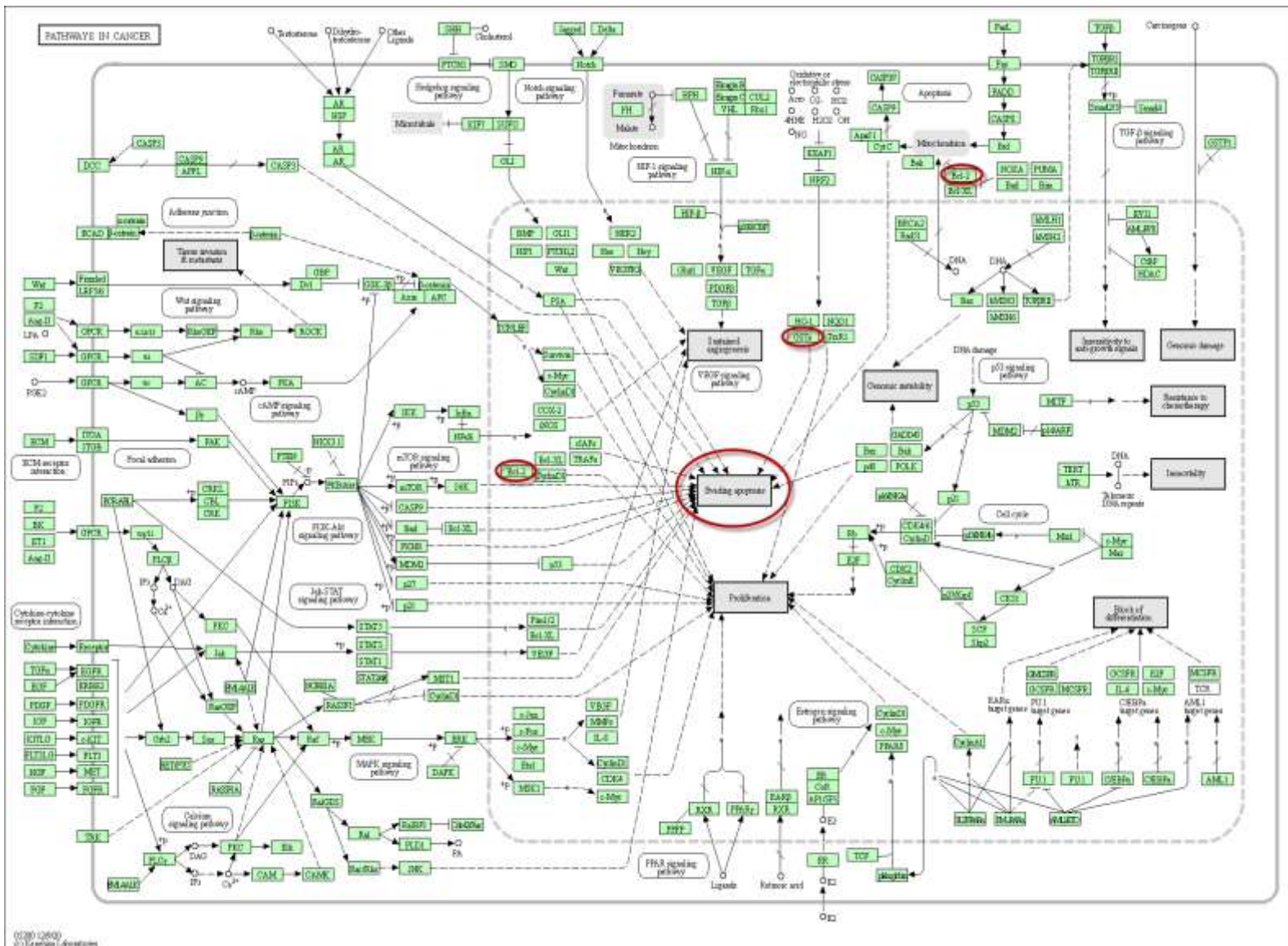
شکل ۱



شکل ۲



شکل ۳



شکل ۴

Prep



## شرح تصاویر

شکل ۱. نتایج ساختاری آنالیز داکینگ برای پروتئین‌های هدف مورد مطالعه و مهارکننده آن‌ها. برای هر کمپلکس، (a) نمایش سه بعدی موقعیت دارو (به رنگ صورتی) در مطلوب‌ترین مدل داک شده، اسیدهای آمینه مجاور با دارو (کمتر از  $4\text{\AA}$ ) با رنگ سبز نشان داده شده‌اند. (b) موقعیت مهارکننده‌ها در کمپلکس‌ها که توسط LigPlot نشان داده شده است. پیوندهای بین اتم‌های لیگاند با رنگ بنفش و پیوندهای بین اتم‌های رسپتور با رنگ قهوه‌ای نشان داده شده‌اند. پیوندهای هیدروژنی نیز با خط چین سبز رنگ بین اتم‌های درگیر نشان داده شده‌اند و برهمکنش‌های غیرپیوندی نیز با یک قوس با پره‌هایی به سمت اتم‌های لیگاندی که با آن‌ها تماس دارند نشان داده شده‌اند (c) نمایش سه بعدی موقعیت دارو در مدل داک شده (صورتی) و ساختار کریستالی (آبی). برای کمپلکس‌های BCL2-LVPK و HER2-HRAP، موقعیت‌های پیشنهاد شده توسط مطالعات داکینگ قبلی (HER2-HRAP قسمت c و BCL2-LVPK قسمت c) برای انتخاب بهترین نتایج اتصال استفاده شد.

شکل ۲. نتایج ساختاری آنالیز Re-dock برای پپتیدهای با خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب و با طول بیش از ۵ اسید آمینه به دست آمده از پروتئین‌های شیر. برای هر کمپلکس، (a) نمایش ۳ بعدی از موقعیت دارو (رنگ آبی) در مطلوب‌ترین مدل Re-dock، اسیدهای آمینه مجاور با دارو (کمتر از  $4\text{\AA}$ ) با رنگ سبز نشان داده شده‌اند. (b) موقعیت مهارکننده‌ها در کمپلکس‌ها که توسط نرم‌افزار LigPlot نشان داده شده است. پیوندهای بین اتم‌های لیگاند با رنگ بنفش و پیوندهای بین اتم‌های رسپتور با رنگ قهوه‌ای نشان داده شده‌اند. پیوندهای هیدروژنی نیز با خط چین سبز رنگ بین اتم‌های درگیر نشان داده شده‌اند و برهمکنش‌های غیرپیوندی نیز با یک قوس با پره‌هایی به سمت اتم‌های لیگاندی که با آن‌ها تماس دارند نشان داده شده‌اند (c) نمایش سه بعدی موقعیت دارو در مدل Re-dock (آبی) و ساختار داک شده (صورتی).

شکل ۳. نقش و عملکرد پروتئین‌های BCL2 و GSTA1 در مسیر سیگنال رسانی مرتبط با مقاومت به داروهای مبتنی بر پلاتین (hsa01524). افزایش بیان پروتئین BCL2 و عملکرد آن در میتوکندری، سبب جلوگیری از وقوع آپوپتوز القا شده توسط سیس پلاتین می‌شود. پروتئین‌های GST با متصل کردن سیس پلاتین و داروهای مشابه آن به مولکول گلوپتایون، سبب افزایش جریان رو به خارج این دارو از طریق ناقلین غشایی می‌گردند.

شکل ۴. نقش و عملکرد پروتئین‌های BCL2 و GSTA1 در مسیرهای مرتبط با سرطان (hsa05200). در بیماری‌زایی سرطان، پروتئین BCL2 با فعال شدن توسط مسیر سیگنال‌رسانی mTOR می‌تواند سبب فرار سلول از آپوپتوز گردد. همچنین عملکرد مهارتی این پروتئین بر آپوپتوز القا شده توسط رسپتور Fas نیز می‌تواند به جلوگیری از وقوع آپوپتوز در سلول کمک کند. پروتئین‌های GST نیز در پاسخ به استرس اکسیداتیو و یا استرس‌های الکتروفیلیک، فعال شده و مجدداً سبب فرار سلول از وقوع آپوپتوز می‌شوند.

شکل ۵. نقش و عملکرد پروتئین‌های BCL2 و GSTA1 در مسیر سرطان‌زایی شیمیایی (hsa05207). پروتئین BCL2 فعال شده در پاسخ به مواد شیمیایی گروه ۱ می‌تواند سبب مهار فرآیند آپوپتوز در سرطان‌هایی مانند سرطان ریه، سرطان مثانه و سرطان کولون شود. همچنین پروتئین‌های GST در پاسخ به ترکیبات شیمیایی گروه ۱ و گروه 2B سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و می‌توانند در بیماری‌زایی سرطان‌های ریه، کبد، پوست و پستان درگیر باشند.

## ***In silico* extraction and screening of apoptosis-activating peptides from milk with the aim of optimizing cancer treatment**

**Elnaz Chitsazzadeh<sup>1</sup>, Farzaneh Mohamadi Farsani<sup>2</sup>, Mohamad Reza Ganjalikhany<sup>1\*</sup>**

**1 Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran**

**2 Department of Biology, Naghshejahan Higher Education Institute, Isfahan, Iran**

### **Abstract**

Bioactive peptides are a group of biological molecules that are naturally present in the structure of proteins and to have biological activity, they must first be released by the proteolysis process. Studies have shown that these peptides have a wide role in the treatment of human diseases, including cancer. Using peptides as anti-cancer drugs is a better alternative for treatment because they specifically target cancer cells and have fewer toxic effects on normal tissues. The aim of this research is to identify the bioactive peptides of milk and to introduce new and potential therapeutic peptides for cancer treatment based on this huge source of proteins and peptides. With this aim, first the protein content of milk (including 7 proteins) was identified and bioactive peptides were extracted from this source. The three-dimensional structure of the peptides was predicted and the library (including 118 peptides) was constructed. Then, 9 main proteins targeted for cancer treatment were identified and their interaction with peptides extracted by docking and virtual screening methods was investigated. Finally, the physicochemical properties of the potential therapeutic peptides were analyzed. The results of research led to the identification of 10 potential therapeutic peptides extracted from milk, which have more power in stopping the function of BCL2 and GSTA proteins as cancer therapeutic targets compared to well-known and widely used inhibitors. The two mentioned proteins play a very important role in the escape of cancer cells from apoptosis, drug resistance to platinum-based drugs, and chemical carcinogenesis.

**Keywords:** Bioactive peptides, Cancer, Apoptosis, Molecular docking, Virtual screening