

## داکینگ مولکولی پپتید CLF 36 با آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H5N8

• انیس صاحب‌نظر (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• مجتبی طهمورث پور

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• محمد هادی سخاوتی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۵-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴-۰۸-۱۳۹۹

Emali: Sahebnazar493@gmail.com



### چکیده

H5N8 از جمله تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزای طیور در ایران است که علاوه بر خسارات در این صنعت می‌تواند انسان را نیز درگیر کند. از جمله مشکلات در ارتباط با ویروس آنفلوانزا می‌توان به افزایش مقاومت سویه‌های در حال گردش این ویروس نسبت به مهارکننده‌های ضدویروسی کنونی است که شناسایی مواد ضدویروسی جدید را الزامی می‌سازد. از جمله این ترکیبات می‌توان به پپتید ضدویروسی CLF36 اشاره کرد که حاصل اتصال دو پپتید از پروتئین لاکتوفیرین شتری (کایمر لاکتوفیرین شتری) می‌باشد که بعضاً فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت سایر گونه‌ها نظیر گاو نشان داده است. هدف از این پژوهش بررسی برهمکنش پپتید CLF36 با آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H5N8 از طریق داکینگ مولکولی می‌باشد. خواص فیزیکیوشیمیایی پپتید CLF36 با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench ۵ بررسی و سپس ساختار سوم این پپتید و آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس از طریق نرم‌افزار Swiss-Model و I-TASSER پیش‌بینی شدند. در ادامه، برهمکنش‌های پپتید CLF36 با آنتی‌ژن‌های سطحی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClusPro۲،۰ و تصحیح ساختارها از طریق نرم‌افزار YASARA Energy Minimization صورت گرفت. میزان صحت ساختارها از طریق نرم‌افزار SAVES v۵،۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان نتایج داکینگ با استفاده از نرم‌افزار PYMOL بررسی شدند. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که انرژی موقعیت اتصال برای آنتی‌ژن‌های هم‌گلوتنین (HA)، نورآمینیداز (NA) و پروتئین ماتریکس ۲ (M2) به ترتیب -۶۷۴.۲، -۵۷۳.۴، -۵۶۷.۰ می‌باشد. بیشترین اسیدآمینوهای درگیر در اتصالات هیدروژنی برای هر سه آنتی‌ژن مربوط به اسیدآمینوهای لیزین و آرژینین بود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که پپتید به جایگاه فعال مربوط به دو آنتی‌ژن HA و NA متصل نشده است؛ در حالیکه این پپتید به جایگاه M2e از M2 متصل شده است که این ناحیه غنی از اپی‌توپ می‌باشد. اسیدآمینوهای پرولین ۱۰ و گلوتامیک اسید هشت مربوط به ناحیه M2e می‌باشد که به ترتیب با اسیدآمینوهای آرژینین ۲۷ و ۲۲ از پپتید CLF36 پیوند هیدروژنی برقرار کرده‌اند. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه امید است در آینده بتوان از اینگونه پپتیدها برای درمان آنفلوانزای طیور با حداقل عوارض جانبی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: H5N8، CLF36، داکینگ مولکولی، هم‌گلوتنین، نورآمینیداز، پروتئین ماتریکس ۲

- Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 54-65

### Molecular docking CLF36 peptide against avian influenza virus subtype H5N8 antigens

By: Sahebazar, A., (Corresponding Author) Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Tahmoorepur, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

and Sekhavati, M. H.,

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2020-08-12 Accepted: 2020-11-04

Emali: Sahebazar493@gmail.com

H5N8 is one of the subtypes of highly pathogenic avian influenza in Iran that could cause damage to birds in addition humans. Among combat existing and emerging drug-resistant influenza viruses, new antiviral drugs as alternative played pivotal roles. It can mention the CLF36 antiviral peptide, which is the result of the binding of two peptides from the camel lactoferrin protein (chimera) has shown more antimicrobial activity than other species such as blf. The objective of this study was to predict the structure of CLF36 peptide and two surface antigens of influenza virus as well as the interaction of this peptide with three antigens of influenza virus subtype H5N8 through molecular docking. The physicochemical properties of CLF36 peptide were evaluated by using CLC Main Workbench 5 software. The third structure of this peptide as well as virus antigens were determined through I-TASSER and Swiss-Model softwares. After that, The CLF36 peptide interacts with these antigens were performed by using the online software ClusPro2.0 and were corrected these structures through the YASARA Energy Minimization software. The quality of the 3D model was evaluated by the SAVES v5.0 software. Finally, the docking results were studied by using PYMOL software. Molecular docking results showed that the position and energy of bonding assessment for hemagglutinin, neuraminidase and Matrix protein 2 were -674.2, -573.4 and -567.0 respectively. Most of peptide's amino acids involved in hydrogen bonds for all three antigens were lysine and arginine residues. Although analysis of the binding sites showed that CLF36 were not binding to the active site of HA and NA antigens, this peptide is attached to the M2e site in M2 protein. The proline 10 and glutamic acid 8 amino acids belongs to the M2e region, which has hydrogen bonds with the amino acids arginine 27 and 22 of the CLF36 peptide, respectively. It is hoped that these peptide can be treatment for avian influenza in the future.

**Keywords:** H5N8, CLF36, Molecular docking, hemagglutinin, Neuraminidase, Matrix protein 2

A بر اساس گلیکوپروتئین‌های سطحی هم‌آگلوتینین (HA) که تراگیری (سه‌جزئی) میله‌ای شکل و نورآمینیداز (NA) که تترامرهای چهار جزئی قارچی شکل می‌باشند، به تحت تیپ‌های متعددی تقسیم می‌شوند. تاکنون ۱۶ تحت تیپ HA و نه تحت تیپ NA در این ویروس‌ها شناسایی شده است. پژوهش‌های مختلف نشان داده است که ویروس‌های تیپ A می‌توانند طیور را آلوده نمایند که ویروس‌های آنفلوآنزای طیور حاد در دسته‌ی H5 و H7 قرار دارند (۴). از جمله تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای نوع A می‌توان به H5N8 اشاره کرد که در بسیاری از کشورها از جمله ایران شناسایی شده است و انسان را نیز درگیر می‌کند. اگرچه H5N8 یکی از زیرگروه‌های کمتر بیماری‌زا تلقی می‌شد، اما در حال تبدیل شدن به یک عامل بیماری‌زای حاد است (۶). یکی از راه‌حل‌های مقابله با این بیماری واکسن است. اگرچه واکسن‌های زنده ضعیف شده و واکسن‌های غیرفعال، سطح قابل قبولی از ایمنی را

### مقدمه

آنفلوآنزای طیور، از جمله بیماری‌های تنفسی مهم و مسری پرندگان است که یکی از تهدیدهای جدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌شود (۱۷). تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوآنزای پرندگان، همگی در خانواده اورتومیگسوویریده و جنس آنفلوآنزا قرار می‌گیرند (۴). این ویروس کروی شکل یا به‌صورت رشته‌ای، به همراه یک پوشش حاوی گلیکوپروتئین است. ماده‌ی ژنتیکی ویروس آنفلوآنزا از RNA تک‌رشته‌ای هشت قطعه‌ای تشکیل شده که پولاریته‌ی منفی است و قادر به کد کردن ۱۰ پروتئین (پروتئین‌های ساختاری PA، PB2، PB1، M1، M2 و پروتئین‌های غیرساختاری NS1، NS2) می‌باشد. ویروس‌های آنفلوآنزا بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنی موجود در نوکلئوپروتئین (NP) و پروتئین ماتریکس (M1) به سه تیپ A، B و C تقسیم می‌شوند که از نظر ساختار ژنوم و بیماری‌زایی با یکدیگر متفاوت هستند (۱۵). ویروس‌های تیپ

و لاکتوفریسین است که در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تولید و تحت شماره ۹۶۰۴۵ در تاریخ ۱۳۹۷/۰۴/۰۵ توسط گروه دکتر طهمورث پور و همکاران ثبت اختراع گردید که این مطالعات مختلفی توسط این تیم بر روی آن صورت گرفته است. طهمورث پور و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای اولین بار، CLF36 را در میزبان HEK-293 بیان کردند (۲۷). سبک خیز و همکاران در سال ۲۰۱۹، فعالیت ضد ویروسی کایمر لاکتوفریسین شتری را علیه ویروس موزاییک توتون و تنباکو مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان از پتانسیل ضد ویروسی این کایمر داشت (۲۳). ردوان و همکاران در سال ۲۰۱۴، گزارش دادند که لوب N از لاکتوفریسین شتر، می‌تواند هم ورود HCV و هم تکثیر داخل سلولی HCV را مهار کند (۲۰). طهمورث پور و همکاران در سال ۲۰۱۹، به بررسی خواص ضد ویروسی CLF36 علیه HCV، بدون اتصال با توالی His-taq پرداختند، که نشان از فعالیت ضد ویروسی و همچنین سمیت پایین این کایمر داشت. همچنین این محققین، به بررسی *in silico* میان این کایمر و ویروس HCV پرداختند که نشان داد CLF36، میل بیشتری به تعامل با لایه جلوی (HCV envelope proteins) E2 دارد، که به عنوان محل اصلی اتصال آنتی‌بادی خنثی‌کننده تعیین شده است (۲۷). پپتید CLF36 از دو زنجیره‌ی مارپیچ آلفا تشکیل شده است و نقطه‌ی ایزوالکتریک آن ۱۱/۳۸ می‌باشد. اینکه ساختار ثانویه دقیقاً چه نقشی را در پپتیدهای ضد ویروسی دارند، نامشخص است. برخی محققین، پیشنهاد کرده‌اند که ساختارهای مارپیچ آلفا یک بخش مهم برای اثر متقابل پروتئین با پروتئین می‌باشد (۳).

امروزه با توجه به گسترش تکنولوژی روش‌های آزمایشگاهی و هزینه‌های بالای آن‌ها، استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک در مطالعات برای تخمین فعالیت مولکول‌های مختلف به عنوان کاندیداهای دارویی پیش از سنتز آن‌ها، فرایند کشف داروهای جدید را تسریع می‌بخشد. یکی از روش‌های کاربردی که مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، استفاده از ابزار محاسباتی و سریع داکینگ مولکولی است (۸).

با توجه به مشکلات درمان‌های رایج، اثرات ضد ویروسی پروتئین لاکتوفریسین علیه ویروس آنفلونزا و پتانسیل ضد ویروسی گسترده پپتید CLF36 مشتق شده از لاکتوفریسین؛ همچنین مقرون به صرفه بودن و تسریع پیش‌بینی برهمکنش پپتید با ویروس به روش‌های بیوانفورماتیک قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی؛ لذا هدف از این پژوهش بررسی برهمکنش پپتید CLF36 با برخی آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس آنفلونزای طيور H5N8 از طریق داکینگ مولکولی است.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی

داده‌های ژنومی و پروتئینی شامل توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای هستند که برای پپتید CLF36 از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) با شماره دسترسی MH327768 و AXN89191 به منظور بررسی خواص فیزیکی شیمیایی و همچنین پیش‌بینی ساختار سه بعدی استخراج شده‌اند. توالی پروتئینی مربوط به دو آنتی‌ژن سطحی HA، NA ویروس آنفلونزای H5N8 از <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> NCBI با شماره‌های دسترسی AJM70565.1 و AJM70567.1 به منظور پیش‌بینی

ایجاد می‌کنند، این نوع واکنش‌ها به‌عنوان ابزاری مناسب، به منظور مقابله با ویروس‌های نوظهور آنفلونزا محسوب می‌شوند. ویروس آنفلونزای A توانایی ایجاد اپیدمی و یا پاندمی‌های بالقوه از طریق موتاسیون در آنتی‌ژن‌های موجود در گلیکوپروتئین سطحی و یا نوترکیبی و تعویض قطعات ژنی بین ویروس‌های مختلف را دارا هستند. این موتاسیون‌ها به ویروس‌های آنفلونزا اجازه می‌دهند که از پاسخ‌های ایمنی میزبان فرار کنند. همچنین افزایش مقاومت سویه‌های در حال گردش نسبت به مهارکننده‌های ضد ویروسی کنونی ویروس آنفلونزا، شناسایی مواد ضد ویروسی جدید و وضعیت عملکرد آن‌ها را الزامی می‌سازد (۲۶). به طور کلی در حال حاضر، عملاً درمان اختصاصی برای عفونت‌های ناشی از ویروس آنفلونزا در پرندگان وجود ندارد. در نتیجه، محققین به دنبال یافتن روش‌هایی برای درمان این‌گونه بیماری‌ها با کمترین اثرات جانبی هستند. از جمله ترکیباتی که مورد توجه قرار گرفتند، می‌توان به پپتیدها با منشأ طبیعی اشاره کرد (۱۲). پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides) دارای طیف گسترده‌ای از خواص ضد ویروسی، باکتریایی و قارچی بوده که معمولاً تعداد اسید آمینه‌های بین ۱۲ تا ۵۰ دارند، حاوی بار مثبت و دارای ساختار آمفی پاتیک می‌باشند (۲۶). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای حاوی آرژینین (به دلیل ساختار گوانیدیوم مثبت) بالاتر از پپتیدهای حاوی لایزین می‌باشد (۲۵). اسید آمینه‌هایی نظیر لایزین و آرژینین، جزء اسید آمینه‌های کلیدی در فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی و بخصوص تشخیص پپتیدهای ضد ویروسی می‌باشد. یک دلیل احتمالی این است که AVP‌هایی که دارای بار مثبت هستند، ممکن است با پوشش ویروس‌هایی نظیر HIV تعامل داشته باشند و مانع ورود ویروس‌ها به سلول‌ها شوند (۱۲). همچنین، اغلب پپتیدهای دارای اسید آمینه‌های آروماتیک (فنیل آلانین، تریپتوفان، تیروزین، هیستیدین)، دارای خواص آمفی فیلیک و کاتیونیک هستند که خاصیت ضد ویروسی بیشتری را نشان می‌دهند (۱۳). از جمله پپتیدهای ضد ویروسی می‌توان به پپتیدهای لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین که از ناحیه N-ترمینال پروتئین لاکتوفریسین ایجاد شده‌اند، اشاره کرد که علاوه بر خواص ضد ویروسی، طیف وسیعی از فعالیت‌های ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضد توموری را نشان می‌دهند (۲۷). بسیاری از محققین تاثیر پپتیدهای ضد ویروسی ناشی از لاکتوفریسین را بر ویروس آنفلونزا گزارش کردند (۲۶). بولسچر و همکاران در سال ۲۰۰۹، برای اولین بار دو پپتید لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین گاوی را از طریق لایزین به یکدیگر متصل کردند (کایمر) و فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی را مورد آزمون قرار دادند، که نشان از فعالیت بیشتر این کایمر نسبت به لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین به صورت مجزا داشت (۹؛ ۶). دلیل فعالیت بیشتر این کایمر نسبت به دو پپتید را، می‌توان به این علت دانست که بار این کایمر مثبت ۱۲+ در برابر لاکتوفریسین ۶+ و لاکتوفرامپین ۴+ می‌باشد (۶، ۷، ۹، ۱۱، ۱۲). این کایمر اثرات قابل توجهی را بر روی برخی گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلاهی نشان داد (۱۳). در برخی گزارشات فعالیت ضدباکتریایی این کایمر، به اندازه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های رایج (۲۸) و یا حتی بهتر بود (۹). همچنین، اثرات هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک و اثرات ضد ویروسی آن نیز گزارش شد (۱۴). CLF36، کایمر لاکتوفریسین شتری حاصل از اتصال دو پپتید لاکتوفرامپین

### داکینگ مولکولی

میانکنش پپتیدها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClusPro، به روش ورودی پپتید به عنوان لیگاند و آنتی‌ژن‌های سطحی به عنوان رسپتور به صورت جداگانه انجام شد. ClusPro، یک سرور تماماً اتوماتیک بوده که به منظور پیش‌بینی میانکنش‌ها میان پروتئین- پروتئین استفاده می‌شود. این برنامه در مرحله اول از PIPER که یک برنامه‌ی داکینگ سخت (rigid) مبتنی بر FFT است، استفاده کرده و ۱۰۰۰ کمپلکس با انرژی اتصال پایین ایجاد می‌کند. این نرم‌افزار در مرحله بعدی، اتصالات پیش‌بینی شده را دسته‌بندی کرده و آن‌هایی که ناپایدارتر هستند را حذف می‌کند. در نهایت توسط شبیه‌سازی مونت کارلو، کمپلکس‌های منتخب بهینه می‌گردند. در نهایت ساختارها به وسیله‌ی Pymol که یک نرم‌افزار کاربردی به منظور مشاهده‌ی پیوندهای هیدروژنی حاصل از داکینگ است، مورد بررسی قرار گرفتند.

### نتایج

#### داده‌های مورد بررسی و آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی

پپتید CLF36، طولی به اندازه ۳۶ اسیدآمینو دارد و نوع و تعداد اسیدآمینوهای آن در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی اسیدآمینوهای تشکیل دهنده پپتید CLF36، نشان داد که بیشترین میزان مربوط به اسیدآمینو لایزین و آرژینین می‌باشد.

#### پیش‌بینی ساختارهای سه بعدی پپتید

نتایج مربوط به بررسی توالی اسیدآمینوهای پپتید CLF36، با استفاده از روش Blast در سایت NCBI نشان داد که شباهت بسیار کمی بین این

ساختار سه بعدی آن‌ها تهیه شدند.

### بررسی خواص فیزیکوشیمیایی

به منظور بررسی خواص فیزیکوشیمیایی از نرم‌افزار 5 CLC Main Workbench استفاده شد. در نهایت، بررسی ساختار دوم، نقطه ایزوالکتریک و همچنین بار الکتریکی پپتید CLF36 با استفاده از نرم‌افزار 5 CLC Main Workbench انجام شد.

### پیش‌بینی و مقایسه ساختار سه بعدی

ساختار سوم (سه بعدی) پپتید CLF36 و دو آنتی ژن سطحی HA، NA با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک پیش‌بینی شدند. بر اساس این روش‌ها، پس از استخراج توالی‌های اسیدآمینوهای پپتید CLF36 و دو آنتی‌ژن سطحی HA و NA، با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین I-TASSER و Swiss-model ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی و برای بررسی پایداری آنتی‌ژن‌ها و پپتیدها در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول)، از نرم‌افزار آنلاین YASARA Minimization Energy Server استفاده گردید. سپس برای ارزیابی دقت پیش‌بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله در نرم‌افزار آنلاین SAVES v5.0 مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت، بهترین ساختارهای پیش‌بینی شده انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. در پایان PDB‌های حاصل برای تمامی ساختارهای پیش‌بینی شده، با استفاده از نرم‌افزار PYMOL مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است، ساختار سه بعدی پروتئین M2 به صورت کریستالوگرافی تعیین شده است و با شماره دسترسی 5DLM در بانک اطلاعات پروتئینی (<https://www.rcsb.org>) موجود است.

جدول ۱- مقایسه وضعیت اسیدآمینوهای پپتید CLF36.

تعداد	آمینواسید	تعداد	آمینواسید
۱	Methionine	۲	Alanine
۰	Asparagine	۱	Cysteine
۱	Proline	۱	aspartic acid
۳	Glutamine	۱	glutamic acid
۴	Arginine	۱	Phenylalanine
۳	Serine	۲	Glycine
۰	Threonine	۰	Histidine
۲	Valine	۱	Isoleucine
۲	Tryptophane	۸	Lysine
۰	Tyrosine	۳	Leucine

جدول ۲- انرژی اتصال kcal/mol کمپلکس‌های حاصل از داکینگ مولکولی.

کمپلکس داک شده	انرژی اتصال
HA+CLF36	-674.2
M2 +CLF36	-567.0
NA +CLF36	-573.4

1، نواحی لایزین ۱۸۶، گلوتامیک اسید ۱۸۵ و ۲۰۷ مربوط به Sialidase propeller 2 و گلوتامیک اسید ۴۱۱ مربوط به Sialidase propeller 6 (شکل ۶).

نتایج حاصل از داکینگ پپتید با M2 نشان داد که پپتید مورد نظر با نواحی پرولین ۱۰، گلوتامیک اسید ۸، سرین ۳۲، فنیل آلانین ۹۹، لیزین ۶۴ و آسپارتیک اسید ۱، تیروزین ۵۸ و آسپارتیک اسید ۶۱ دارای پیوند هیدروژنی است (شکل ۵) که گلوتامیک اسید ۸ و پرولین ۱۰ مربوط به ناحیه M2e که غنی از اپی‌توپ است می‌باشد و این اتصال مناسب می‌باشد. تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی؛ همچنین اتصالات آبرگیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

### بحث

آنفلوانزا یکی از مشکلات رایج در صنعت طیور در سراسر جهان است. تلاش برای جلوگیری از آنفلوانزا توسط واکسیناسیون به دلیل توانایی ویروس در جهش سریع و ترکیب مجدد ویروس‌های آنتی‌ژنیک پیچیده است و گاهی منجر به ظهور ویروس کاملاً جدید می‌شود (۲۶). ازین رو محققین به دنبال یافتن ترکیباتی ضدویروسی با منشا طبیعی هستند که طیف گسترده‌ای از اثرات را اعمال کنند و ظهور مقاومت به دارو را به حداقل برسانند (۱۱).

مطالعات نشان داده‌اند که لاکتوفرین یک ترکیب اصلی ضد میکروبی شیر، می‌تواند با تداخل در عملکرد کاسپاز ۳ و با جلوگیری از انتقال ریبونوکلئوپروتئین‌های ویروسی از هسته به سیتوپلاسم، آپوپتوز ناشی از آنفلوانزا را مهار کند (۲۶). علاوه بر این قادر است نه تنها با پوشش ویروسی، بلکه با گیرنده‌های موجود در غشای سلولی ویروس از طریق تعامل با آنتی‌ژن‌ها ارتباط برقرار کند. بنابراین، لاکتوفرین می‌تواند به عنوان یک عامل احتمالی با توانایی ایجاد اختلال در پوشش ویروس شناخته شود (۲۶).

آنتی‌ژن هم‌گلوتینین قادر به آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز از طریق اتصال به گیرنده‌های اسید سیالیک می‌باشد. از این رو یک مولکول هم‌گلوتینین دارای سه محل اتصال به سلول گیرنده می‌تواند است (۱). این پروتئین دارای دو زیر بخش HA1 و HA2 (به ترتیب ۴۷ و ۲۹ KDa) بوده که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند و نواحی سر کروی و ساقه را تشکیل می‌دهند (۲۹). اسیدآمینوهای زیر واحد HA2 و بخشی از ابتدای زیرواحد HA1 ساختار ساقه را تشکیل

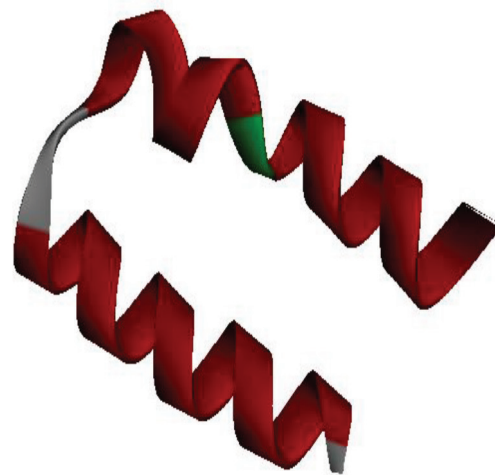
توالی با سایر ساختارهای سه بعدی ثبت شده وجود دارد. در نتیجه از نرم افزار I-Tasser استفاده گردید. بررسی میزان صحت با نرم‌افزار SAVES ۷5.0 و بررسی پلات رام‌چاندرا نشان داد که میزان صحت حدود ۸۳٪ است. ساختار تصحیح شده به صورت زیر با صحت ۹۰٪ پیش‌بینی گردید (شکل ۱).

### داکینگ مولکولی پپتید CLF36 با آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس آنفلوانزا

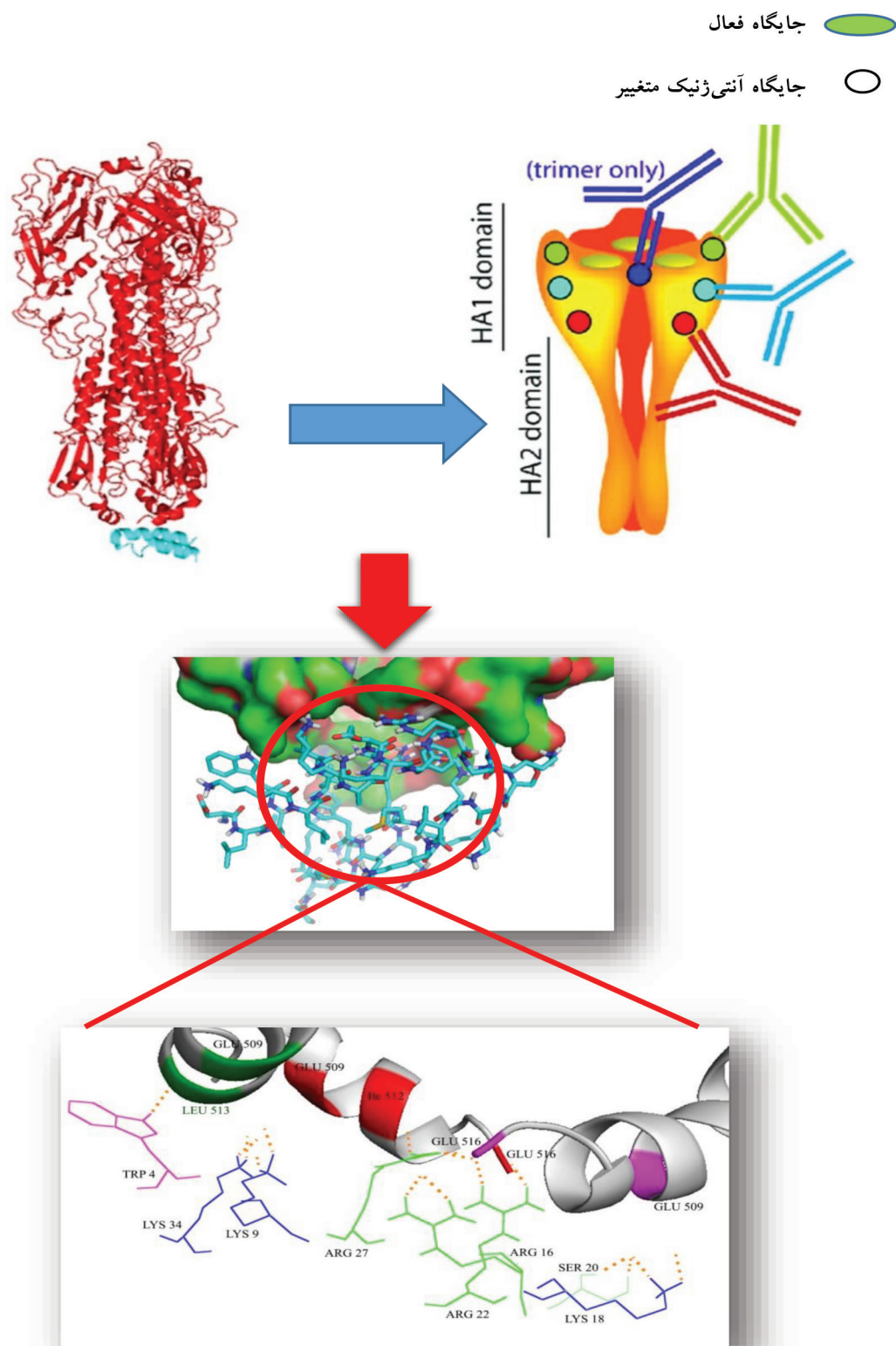
نتایج مربوط به داکینگ پپتید CLF36 با آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس آنفلوانزا در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج بررسی موقعیت و انرژی اتصال نشان می‌دهد که پپتید با کمترین میزان انرژی مربوط به کمپلکس پپتید با آنتی‌ژن HA ویروس آنفلوانزا می‌باشد. تعداد پیوندهای هیدروژنی مربوط به داکینگ پپتید با M2، HA و NA به ترتیب هشت، نه و هشت می‌باشد. بیشترین تعداد پیوندهای هیدروژنی متعلق به M2 است. علاوه بر این، بیشترین اسیدآمینوهای درگیر در این اتصالات برای هر سه آنتی‌ژن مربوط به اسیدآمینوهای لایزین و آرژینین می‌باشد.

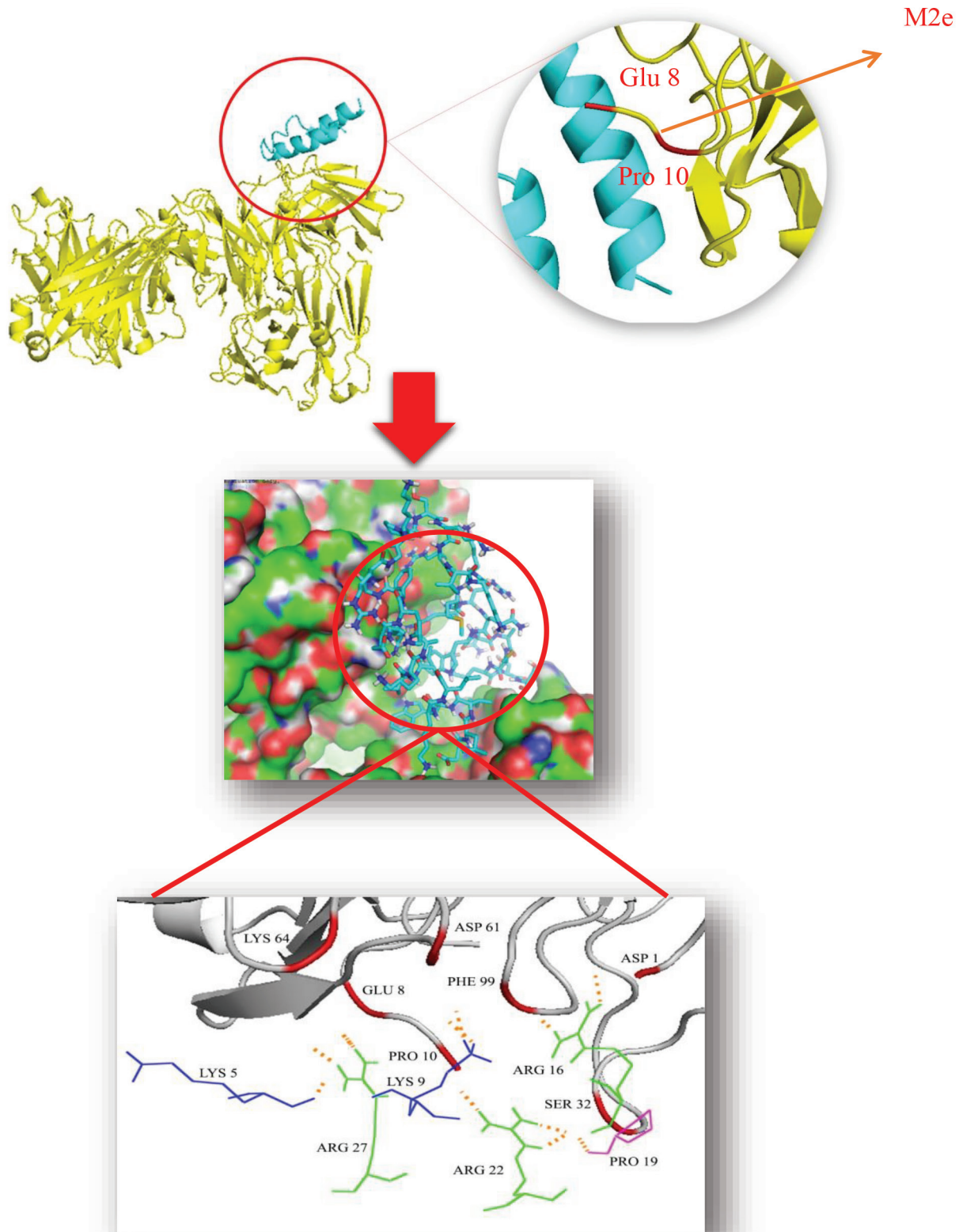
نتایج داکینگ مولکولی نشان داد پپتید مورد نظر در ناحیه انتهایی ساقه C-ترمینال زیر واحد HA2 از آنتی‌ژن HA متصل شده است که شامل: گلوتامیک اسید ۵۰۹ و ۵۱۶ از زنجیره‌ی یک، گلوتامیک اسید ۵۰۹، ۵۱۶ و ایزولوسین ۵۱۲ مربوط به زنجیره‌ی دو، همچنین گلوتامیک اسید ۵۰۹ و لوسین ۵۱۳ مربوط به زنجیره‌ی سه (شکل ۴) می‌باشد که متصل به جایگاه مناسب و فعال آنتی‌ژن مربوطه نبود. همچنین، پپتید به جایگاه مناسب و فعال آنتی‌ژن NA نیز متصل نشد (نواحی والین ۱۲۵، آرژینین ۱۲۸ و ۱۷۱، گلوتامیک اسید ۱۶۰ مربوط به ناحیه‌ی Sialidase propeller



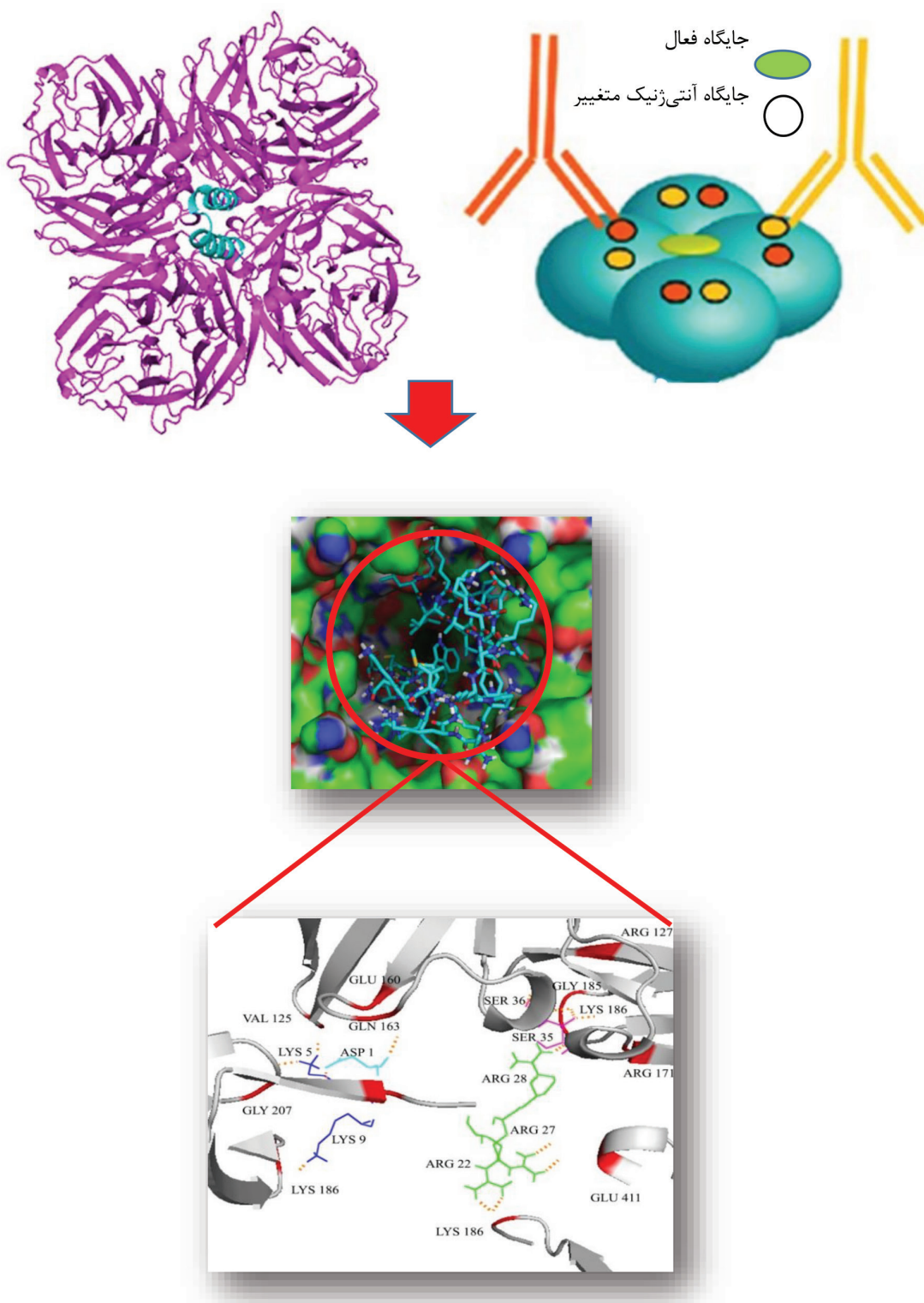
شکل ۱- پیش‌بینی ساختار سه بعدی پپتید CLF36.



شکل ۴- نتایج داکینگ CLF36 با آنتی ژن Ha ویروس آنفلوانزا.  
 (نقطه چین نارنجی رنگ نشان دهنده پیوندهای هیدروژنی می باشد).



شکل ۵- نتایج داکینگ مولکولی پپتید ۳۶ CLF با آنتی ژن M2 و ویروس آنفلوانزا.





داد که لاکتوفرین قادر به اتصال HA ویروسی و مهار هماگلوتیناسیون ویروس‌های آنفلوآنزای A مانند H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> و H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> است. لاکتوفرین به یک منطقه از زیر واحد HA<sub>2</sub> متصل می‌شود که شامل اپی‌توپ‌های محافظت شده است و از این طریق منجر به ایجاد تغییر شکل فضایی آنتی‌ژن و عدم اتصال آن به سیالیک اسید می‌شود (۱). مطالعه‌ی ما نشان داد که CLF<sub>36</sub> به ناحیه‌ی مناسبی از آنتی‌ژن HA متصل نمی‌شود که دلیل آن را می‌توان به این موضوع اشاره کرد که فعالیت ضدویروسی لاکتوفرین به پپتیدهای لوب C آن نسبت داده شده است، در حالی که لوب N آن که پپتید ۳۶ CLF از آن مشتق شده است نقشی در این موضوع ندارد (علت آن بصورت واضح مشخص نیست) (۱) که مطابق با نتایج این پژوهش می‌باشد.

نورامینیداز به عنوان یک تترامر متشکل از چهار پلی‌پپتید یکسان است که تقریباً ۱۰-۲۰٪ از کل گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح ویروس را تشکیل می‌دهد. به طور کلی ساختارهای مربوط به NA در H<sub>5</sub>N<sub>x</sub> بین ۴۵٪ تا ۶۵ شباهت دارند (۲۷). این آنتی‌ژن از حدود ۴۷۰ اسید آمینه تشکیل شده که تشکیل چهار بخش را می‌دهند: دم سایتوپلاسمیک، دامنه تراغشایی، ساقه، دامنه سر. دم سایتوپلاسمیک از جمله بخش‌های حیاتی در عملکرد NA ویروس می‌باشد (۱۸). دامنه N-ترمینال آن تقریباً ۱۰۰٪ در کلیه تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای A حفظ شده و از دنباله MNPNQK تشکیل شده است. ناحیه‌ی N-ترمینال دامنه تراغشایی منجر به اتصال NA به پوشش ویروس می‌شود که شامل توالی متنوعی از اسیدهای آمینه ۷-۲۹ بوده که تشکیل ساختار ماریپج آلفا را می‌دهند (۲۷). دامنه ساقه در زیرگروه‌های مختلف ویروس‌های آنفلوآنزای A دارای برخی ویژگی‌های مشترک است (همه‌ی آن‌ها دارای حداقل یک سیستمین و یک جایگاه

می‌دهند. قسمت داخلی ناحیه ساقه به صورت ماریپج سه رشته‌ای طویل می‌باشد که تا حدودی به سمت انتهای ساقه یعنی جایی که ناحیه‌ی انتهایی آمینی HA<sub>2</sub> (پپتید اتصال) قرار دارد، گسترش می‌یابد. ناحیه سر مولکول HA یک ناحیه کروی غنی از ساختار β است و به طور کامل از اسید آمینه‌های زیر واحد HA<sub>1</sub> تشکیل شده است (۱). این ناحیه دارای اکثر مکان‌های آنتی‌ژنیک می‌باشد. در این ساختار جایگاه حفاظت شده پاکت ماندی برای اتصال به گیرنده‌های اسید سیالیکی سلول‌ها وجود دارد که اطراف این جایگاه اتصال به گیرنده به وسیله نواحی آنتی‌ژنیک احاطه شده‌اند. از آنجایی که این جایگاه‌های آنتی‌ژنیک از نوع اپی‌توپ‌های فضایی هستند، لذا تغییرات ساختاری در ناحیه HA<sub>1</sub> می‌تواند در اتصال آن به آنتی‌بادی‌های خنثی کننده موثر واقع شود (۲۹). به طور کلی مونومر HA<sub>1</sub> واسطه‌ی اتصال هماگلوتینین به سطح سلول میزبان است و مونومر HA<sub>2</sub> با خاصیت آگریزی لنگر غشایی را تشکیل می‌دهد که مسئول الیگومریزه شدن پروتئین به شکل تریمری است (۱). توالی اسید آمینه‌ای انتهایی کربوکسیلی HA<sub>2</sub> برای اتصال HA به غشاء لیپیدی ویروس اهمیت دارد و ناحیه‌ی انتهایی آمینی آن یک بخش غیر قطبی و به شدت حفاظت شده است که پپتید اتصال نامیده می‌شود (GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYG) که بطور نسبی در تمامی تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای A حفظ شده‌اند (۳۰). پپتیدهای مختلفی گزارش شدند که از طریق مختلف مانع موجب مهار ویروس آنفلوآنزا می‌شوند. اسکالا و همکاران، ۲۰۱۷ اثر سه پپتید مشتق شده از لوب C لاکتوفرین را بر روی ویروس آنفلوآنزا مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند این پپتیدها در غلظت فمنتو-پیکومولار منجر به مهار ویروس آنفلوآنزا و آلودگی سلول میزبان می‌شوند (۲۴). مطالعات نشان

جدول ۳. تعداد و طول پیوند هیدروژنی، همچنین اتصالات آگریز کمپلکس پپتید با آنتی‌ژن M2 (رنگ قرمز نشان دهنده ی اتصال به اپی توپ می باشد).

اتصالات آگریز	طول پیوند هیدروژنی (Å)	پیوندهای هیدروژنی (آنتی‌ژن-پپتید)	تعداد پیوند هیدروژنی	کمپلکس داک شده
Ser56, Leu57, Tyr59, Pro100, Ser97, His 98	۱/۷	Lys5-Lys64	۹	M2 + CLF36
	۲/۱	Arg27-Glu8		
	۱/۷	Arg27-Tyr58		
	۱/۸	Arg22-Pro10		
	۲/۱	Arg22-Ser32		
	۱/۹	Pro10-Ser32		
	۱/۷	Arg16-Phe99		
	۱/۹	Arg16-Asp1		
	۱/۸	Lys9-Asp61		

(۱۹). برخلاف HA و NA، پپتید CLF36 به یکی از اپی‌توپ‌های مهم در ناحیه‌ی M2e از M2 متصل شد که می‌توان فعالیت ضدویروسی CLF36 علیه آنفلونزا را به آن نسبت داد. در رابطه با تأثیر پروتئین لاکتوفرین و پپتیدهای آن بر روی M2 تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. از آنجاییکه M2 بطور قابل توجهی بین تحت‌تیپ‌های این ویروس حفاظت شده است. لذا می‌تواند بعنوان گزینه‌ای مناسب برای مهار این ویروس باشد (۱۹).

### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه از طریق روش‌های بیوانفورماتیکی ساختارهای سه بعدی پپتید CLF36، آنتی‌ژن‌های سطحی HA، NA و ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H5N8 با موفقیت پیش بینی شدند. سپس میانکشی CLF36 با HA، NA و M2 انجام شد که نشان داد از پتانسیل ضدویروسی این پپتید علیه M2 داشت. امید است در آینده بتوان از اینگونه پپتیدها برای درمان بیماری‌هایی همچون آنفلوانزا به صورت مستقل یا به همراه سایر داروها با حداقل عوارض جانبی استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

### منابع مورد استفاده

1. Ammendolia, M. G., Agamenzone, M., Pietrantonio, A., Lannutti, F., Siciliano, R. A., De Giulio, B., ... & Superti, F. 2012. Bovine lactoferrin-derived peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus. *Pathogens and global health*, 106(1), 12-19. 29
2. Anderson, T., I. Capua, G. Dauphin, R. Donis, R. Fouchier, E. Mumford, M. Peiris, D. Swayne and A. Thiermann. 2010. FAO-OIE-WHO Joint Technical Consultation on Avian Influenza at the Human-Animal Interface. *Influenza and other respiratory viruses* 4: 1-29.
3. Azzarito, V., K. Long, N.S. Murphy and A.J. Wilson. 2013. Inhibition of  $\alpha$ -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nature chemistry* 5(3): 161-173.
4. Beato, M.S., M. Mancin, J. Yang, A. Buratin, M. Ruffa, S. Maniero, A. Fusaro, c. Terregino, X.F. Wan and I. Capua. 2013. Antigenic characterization of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Egyptian poultry. *Virology* 435(2): 350-356.
5. Beerens, N., R. Heutink, S.A. Bergervoet, F. Harders, A. Bossers, and G. Koch. 2017. Multiple reassorted viruses as cause of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus epidemic, the Netherlands, 2016. *Emerging infectious diseases* 23(12): 1974.
6. Bolscher, J. G., R. Adão, K. Nazmi, P.A. van den Keybus, W. van't Hof, A.V.N. Amerongen, and E.C. Veerman. 2009. Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic

گلیکوزیلاسیون هستند)، اما تعداد و توالی اسید آمینه‌های آن به طور قابل توجهی متفاوت می‌باشد. سر کاتالیتیکی تمامی NAها شامل یک ساختار جعبه‌ای شکل است که از چهار مونومر تشکیل شده است (۱۸). هر مونومر به شکل یک six-bladed propeller است که هر قسمت دارای چهار anti-parallel  $\beta$ -sheets می‌باشد که توسط پیوندهای دی سولفید تثبیت شده و توسط حلقه‌هایی با طول متغیر متصل می‌شوند. هر مونومر در سطح خود دارای یک جایگاه کاتالیتیکی می‌باشد که موجب برش سیالیک اسید می‌شود (۱۸). نقشه‌برداری فیلوژنیک که شامل مقایسه‌ای از روابط ژنتیکی و ساختاری بین NAها از ویروس‌های مختلف است نشان داد که NA مربوط به ویروس‌های آنفلوانزای گروه (N1-N9)A در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند. گروه یک شامل سروتیپ‌های N1، N4، N5 و N8 است، در حالی که گروه دو شامل سروتیپ‌های N2، N3، N6، N7 و N9 می‌باشند (۲۲). جایگاه فعال NA شامل یک بخش داخلی متشکل از هشت اسیدآمینه بسیار محافظت شده است که به طور مستقیم ( Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 and Tyr406) با اسیدهای سیالیک در تعامل هستند (۱۸). علاوه بر این، یک قسمت بیرونی از ۱۰ اسیدآمینه وجود دارد که با اسید سیالیک در تماس نیست، اما نقش ساختاری مهمی دارند که شامل Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Asn294 و Glu425 می‌باشند. سه اسیدآمینه آرژینین (292, Arg118, Arg371) با کربوکسیلات اسید سیالیک در تعامل هستند. Arg152 به حلقه قند گروه استامیدو متصل می‌شود، در حالی که Glu276 با گروه‌های ۸- و ۹- هیدروکسیل در زنجیره جانبی گلیسرول تعامل دارد. گفته می‌شود که جایگاه فعال آنزیم بسیار محافظت شده هستند که ویژگی مهمی در طراحی دارو می‌باشد (۱۸). در این مطالعه اتصال CLF36 به جایگاه مناسبی از آنتی‌ژن NA و جایگاه فعال صورت گرفت. مطالعات کمی در ارتباط با بررسی بیوانفورماتیک اثر پپتیدهای ضدویروسی بر NA وجود دارد. لی و همکاران ۲۰۱۸، به بررسی اثر یک پپتید مستخرج از پوست ماهی (پپتید P) پرداختند که این پپتید اثر ضدویروسی خود را از طریق اتصال به چندین جایگاه اعمال می‌کند که از این میان Pro21 مهم‌ترین نقش را در ایجاد پیوند هیدروژنی در جایگاه فعال بازی می‌کند (۱۶).

توالی M2 بسیار محافظت شده است، اما قسمت خارج سلولی آن به عنوان یک آنتی‌ژن بالقوه عمل می‌کند. در دامنه‌ی خارج سلولی (M2e) M2 ۲۳ اسیدآمینه (MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSS) وجود دارد و یک منطقه بسیار محافظت شده در همه ویروس‌های آنفلوانزا A است. شایان ذکر است، مطالعات نشان داده است که اپی‌توپ‌های M2e نقش مهمی در ایمنی‌زایی دارند (۱۹). به عنوان مثال، اگرچه ایمن‌سازی با یک ناحیه‌ی کوتاه شده از M2e (اسیدهای آمینه ۲-۱۶) به همراه ترکیبات ادجوانت منجر به شکل‌گیری سطح بالایی از آنتی‌بادی‌های anti-M2e نمی‌شود، پژوهشگران نشان دادند که استفاده از این ناحیه با حامل فاژ F88 قادر به تولید سطح بالایی از آنتی‌بادی‌های anti-M2e و القای پاسخ سلول‌های T می‌شود. همچنین مطالعات نشان دادند اسیدآمینه‌های ۱۷-۲۴ برای تشکیل پاسخ سلول‌های T نیز اهمیت دارند. پژوهشگران نشان دادند که ناحیه‌ی ۱۳-۴ بعنوان اپی‌توپ سلول B به رسمیت شناخته شده است و همچنین یک اپی‌توپ بالقوه در نواحی ۱۲-۸ گزارش شده است

- strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie* 91(1): 123-132.
7. Bolscher, J., K. Nazmi, J. van Marle, W. van 't Hof and E. Veerman. 2012. Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against *Candida albicans*. *Biochemistry and Cell Biology* 90(3): 378-388.
8. Chaudhary, K. K., and Mishra, N. 2016. A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *databases*, 3(4):28
9. Flores-Villaseñor, H., A. Canizalez-Román, M. de la Garza, K. Nazmi, J.G. Bolscher and N. Leon-Sicairos. 2012. Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells. *Biochimie* 94(9): 1935-1942.
10. Flores-Villaseñor, H., A. Canizalez-Román, M. Reyes-Lopez, K. Nazmi, M. de la Garza, J. Zazueta-Beltrán, and J. G. Bolscher. 2010. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals* 23(3): 569-578.
11. Hadley, B. E., and R. E.W Hancock. 2010. Strategies for the discovery and advancement of novel cationic antimicrobial peptides. *Current topics in medicinal chemistry* 10(18): 1872-1881.
12. Hancock, R. E. and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9): 402-410.
13. Jenssen, H., J.H. Andersen, D. Mantzilas, and T.J. Gutteberg. 2004. A wide range of medium-sized, highly cationic,  $\alpha$ -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral research* 64(2): 119-126.
14. Leon-Sicairos, N., A. Canizalez-Roman, M. de la Garza, M. Reyes-Lopez, J. Zazueta-Beltran, K. Nazmi, and J.G. Bolscher. 2009. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochimie* 91(1): 133-140.
15. Li, F., C. Ma and J. Wang. 2015. Inhibitors targeting the influenza virus hemagglutinin. *Current medicinal chemistry*, 22(11): 1361-1382.
16. Li, J., Chen, Y., Yuan, N., Zeng, M., Zhao, Y., Yu, R., ... & Dong, S. 2018. A novel natural influenza A H1N1 virus neuraminidase inhibitory peptide derived from cod skin hydrolysates and its antiviral mechanism. *Marine drugs*, 16(10), 377.30
17. Lupiani, B. and S.M. Reddy. 2009. The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4): 311-323.
18. McAuley, J. L., B.P. Gilbertson, S. Trifkovic, L.E. Brown and J.L. McKimm-Breschkin. 2019. Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Frontiers in microbiology*, 10: 39.
19. Mezhenskaya, D., I. Isakova-Sivak and L. Rudenko. 2019. M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development. *Journal of biomedical science*, 26(1): 76.
20. Redwan, E. M., E. M. EL-Fakharany, V. N. Uversky and M. H. Linjawi. 2014. Screening the anti infectivity potentials of native N-and C-lobes derived from the camel lactoferrin against hepatitis C virus. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1): 219.
21. Reyes-Cortes, R., E. Acošta-Smith, R. Mondragón-Flores, K. Nazmi, J. G. Bolscher, A. Canizalez-Roman, and N. Leon-Sicairos. 2017. Antibacterial and cell penetrating effects of LFcin17–30, LFampin265–284, and LF chimera on enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1): 76-81.
22. Russell, R. J., L. F. Haire, D. J. Stevens, P. J. Collins, Y. P. Lin, G. M. Blackburn and J. J. Skehel. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*, 443(7107): 45-49.
23. Sabokkhiz, M. A., A. Tanhaeian and M. Mamarabadi. 2019. Study on Antiviral Activity of Two Recombinant Antimicrobial Peptides Against Tobacco Mosaic Virus. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4): 1370-1378.
24. Scala, M. C., Sala, M., Pietrantonio, A., Spensiero, A., Di Micco, S., Agamennone, M., ... & Superti, F. 2017. Lactoferrin-derived peptides active towards influenza: identification of three potent tetrapeptide inhibitors. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.31
25. Shafer, W. M., F. Hubalek, M. Huang and J. Pohl. 1996. Bactericidal activity of a synthetic peptide (CG 117-136) of human lysosomal cathepsin G is dependent on arginine content. *Infection and immunity*, 64(11): 4842-4845.
26. Skalickova, S., Z. Heger, L. Krejcova, V. Pekarik, K. Bašl, J. Janda and R. Kizek. 2015. Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses*, 7(10): 5428-5442.
27. Tahmoorespur, M., M. Azghandi, A. Javadmanesh, Z. Meshkat and M. H. Sekhavati. 2019. A novel chimeric anti-HCV peptide derived from camel lactoferrin and molecular level insight on its interaction with E2. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1-13.
28. Tang, Z., Y. Yin, Y. Zhang, R. Huang, Z. Sun, T. Li and Q. Tu. 2008. Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricin–lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d. *British Journal of Nutrition*, 101(7): 998-1005.
29. Ward, C. W., P.A. Gleeson and T. A. Dopheide. 1980. Carbohydrate composition of the oligosaccharide units of the haemagglutinin from the Hong Kong influenza virus A/Memphis/102/72.

*Biochemical Journal*, 189(3): 649-652.

30. Worch, R., A. Dudek, J. Krupa, A. Szymaniec and P. Setny.

2018. Charged N-terminus of influenza fusion peptide facilitates membrane fusion. *International journal of molecular sciences*,

19(2): 578.

31. Yang, H., P. J. Carney, V. P. Mishin, Z. Guo, J. C. Chang, D.

E. Wentworth and J. Stevens. 2016. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent

H5Nx avian influenza viruses. *Journal of virology*, 90(12):5770-5784.

