ORIGINAL ARTICLE

Design and Bioinformatic Evaluation of Multi-Epitope Protein to Diagnose Strongyloidiasis Infection

Sonia Sadeghpour[1],
Hojat Ghasemnejad- Berenji[2],
Yalda Malekzadegan[3],
Sahar Rezaei Arablouydareh[4],
Mohammadreza Pashaei[5],
Javad Fathi[6],
Yousof Karmai[7],
Mohamad Sabaghan[8],
Mortaza Taheri-Anganeh[9]

[1] Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Reproductive Health Research Center, Clinical Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Saveh University of Medical Sciences, Saveh, Iran
[4] MSc in Clinical Biochemistry, Reproductive Health Research Center, Clinical Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[6] PhD in Medical Bacteriology, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[7] PhD in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[8] Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Behbahan Faculty of Medical Sciences, Behbahan, Iran
[9] Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

(Received June 25, 2023 ; Accepted October 14, 2023)

Abstract

Background and purpose: Serological diagnosis of Strongyloides stercoralis (S. stercoralis) is often challenging due to cross-reactivity with other parasitic nematodes. Therefore, it is imperative to introduce new high-performance serological tests to flawlessly diagnose this neglected parasitic infection that enters through the digestive system and can even affect infertility. The purpose of the present study was to design a multi-epitope structure for the detection of S. stercoralis.

Materials and methods: The present study is a computational immunoinformatics study. To this end, the highly antigenic parts and potential immunodominant epitopes of S. stercoralis were identified from the two antigenic proteins first and then all the selected parts were connected by a suitable linker. Next, the physicochemical characteristics of the designed structure were analyzed. Finally, tertiary structures were built and evaluated to determine the best ones.

Results: Bioinformatics evaluation indicated that the designed protein structure can be hydrophilic, heat stable and acidic. In addition, the 3D model made was similar to the structure of natural proteins.

Conclusion: Based on the findings of the study, the designed structure can be used as an efficient antigen in the ELISA system for the serological diagnosis of human strongyloidiasis.

Keywords: antigen, antibody, serological diagnosis, bioinformatcs

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 222-231 (Persian).

Corresponding Author: Mohamad Sabaghan- Department of Basic Sciences, Behbahan Faculty of Medical Sciences, Behbahan, Iran (E-mail: mohamadsabaghan1986@yahoo.com) and **Mortaza Taheri-Anganeh -** Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (E-mail: mortazataheri@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه ۲ آذر سال ۱۴۰۲ (۲۳۱-۲۲۲)

طراحی و ارزیابی بیوانفورماتیکی پروتئین مولتی اپی توپ جهت تشخیص عفونت استرونژیلوئیدازیس

سونیا صادق پور[۱]
حجت قاسم نژاد برنجی[۲]
یلدا ملک زادگان[۳]
سحر رضایی عربلوی دره[۴]
محمدرضا پاشایی[۵]
جواد فتحی[۶]
یوسف کرمی[۷]
محمد صباغان[۸]
مرتضی طاهری انگنه[۹]

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص سرولوژیکی Strongyloides stercoralis (S. stercoralis) به دلیل واکنش متقابل با سایر نماتدهای انگلی اغلب چالش برانگیز است. بنابراین، لازم است برای تشخیص صحیح این عفونت انگلی نادیده گرفته شده از طریق سیستم گوارش وارد شده و حتی می‌تواند بر نازایی هم موثر باشد، آزمایش‌های سرولوژیکی جدید با کارایی بالا معرفی شوند. این مطالعه با هدف، طراحی یک ساختار چند اپی توپی برای تشخیص S. stercoralis انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر یک مطالعه ایمونوانفورماتیک محاسباتی می‌باشد. برای هدف این مطالعه، ابتدا بخش‌های بسیار آنتی‌ژنیک و اپی‌توپ‌های بالقوه ایمنی غالب S. stercoralis از دو پروتئین آنتی‌ژنیک شناسایی شدند و سپس تمام قسمت‌های انتخاب شده توسط یک پیونددهنده مناسب به هم متصل شدند. در ادامه، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سازه طراحی شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس سازه‌های ثالثی سازه ساخته و مورد ارزیابی قرار گرفتند تا بهترین آن‌ها مشخص شود.

یافته‌ها: ارزیابی بیوانفورماتیک نشان داد که ساختار پروتئینی طراحی شده می‌تواند آبدوست، پایدار در برابر حرارت و اسیدی باشد. هم‌چنین مدل سه بعدی ساخته شده مشابه ساختار پروتئین‌های طبیعی بود.

استنتاج: با توجه به نتایج مطالعه، سازه طراحی شده می‌تواند به عنوان یک آنتی ژن کارآمد در سیستم ELISA برای تشخیص سرولوژیک استرونژیلوئیدیازیس انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتی ژن، آنتی‌بادی، تشخیص سرولوژیک، بیوانفورماتیک

مولف مسئول: محمد صباغان– بهبهان: خیابان شهید زیبایی، دانشکده علوم پزشکی بهبهان، گروه علوم پایه E-mail: mohamadsabaghan1986@yahoo.com
و مرتضی طاهری انگنه– ارومیه: بلوار ارشاد، خیابان شفا، ساختمان حکیم جرجانی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی E-mail: mortazataheri@yahoo.com
۱. استادیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، پژوهشکده تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ساوه، ساوه، ایران
۴. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، پژوهشکده تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۵. استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۶. دکتری باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۷. دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۸. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
۹. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۵/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۷/۲۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

استرونژیلوئیدازیس یک بیماری استوایی نادیده گرفته شده (Neglected Tropical Disease: NTD) است که در اثر عفونت میزبان با نماتد منتقل شده از خاک از جنس Strongyloides ایجاد می‌شود. بیش‌ترین آلودگی انسان‌ها به این عفونت توسط *Strongyloides stercoralis* ایجاد می‌شود. اعتقاد بر این است که S. stercoralis بیش از ۳۷۰ میلیون نفر را در سراسر جهان آلوده کرده است(۱). Strongyloides معمولاً در روده کوچک زندگی و تخم‌گذاری می‌کنند و لاروهای هچ شده سپس از روده بزرگ عبور نموده و به طور بالقوه در خود عفونت داخلی به مخاط کولون یا رکتوم نفوذ می‌کنند. در موارد کولیت حاصل از Strongyloides، انگل روده بزرگ را آلوده می‌کند. علاوه بر این، کولیت استرونژیلوئید ممکن است در بیمارانی که نقص ایمنی دارند، رخ دهد. در حالی که علائم بالینی کولیت حاصل از Strongyloides ممکن است به‌طور قابل توجهی با بیماری‌های التهابی روده (Inflammatory bowel disease) همپوشانی داشته باشد، یافته‌های آندوسکوپی یا بافت شناسی نیز ممکن است دچار خطا باشد(۲). استرونژیلوئیدازیس هم‌چنین با بیماری‌های تهدید کننده زندگی همراه است. سرکوب سیستم ایمنی به انگل اجازه می‌دهد تا به سرعت در روده کوچک تکثیر شود و از طریق روده به جریان خون و سایر اندام‌ها مهاجرت کند. این بیماری استرونژیلوئید-یازیس منتشر (disseminated strongyloidiasis: DS) یا سندرم هایپر عفونت (Hyper-infection syndrome: HS) نامیده می‌شود که میزان مرگ و میر آن ۸۵ تا ۱۰۰ درصد در اثر سپسیس بسیار زیاد است(۳).

مطالعاتی نیز در مورد شیوع استرونژیلوئیدازیس در دوران بارداری وجود دارد. اگرچه داده‌ها کمیاب است اما عفونت این انگل با ناتوانی‌های رشدی و کم خونی در دوران بارداری همراه است، هم‌چنین عفونت بیش از حد ممکن است باعث مرگ مادر و نوزاد شود. استرونژیلوئیدازیس مزمن با پاسخ ایمنی Th2 همراه است. سلول‌های Th2 سیستم پاسخ ایمنی هومورال و ترشح IL4 و IL5 را فعال می‌کنند. IL4 در نهایت تولید IgE را تحریک می‌کند و IL5 به ائوزینوفیل‌ها سیگنال می‌دهد. بنابراین، عفونت Strongyloides قادر است ایمنی میزبان را کاهش دهد، از حذف خود توسط سیستم ایمنی محافظت کند و هم‌چنین آسیب شناسی شدید را در میزبان به حداقل برساند(۴).

مانع اصلی برای درک توزیع، بار و مشخصات بالینی عفونت مزمن (اغلب بدون علامت) S. stercoralis حساسیت ضعیف روش‌های تشخیصی موجود است. با توجه به تظاهرات بالینی پر جنب و جوش و تعداد زیادی از لاروها که اغلب در مدفوع یا سایر مایعات بدن از جمله مایع لاواژ مغزی نخاعی و برونکوآلوئولار لاواژ وجود دارد، تشخیص سندرم هایپر عفونت/ عفونت منتشر S. stercoralis بسیار دشوارتر است. اگرچه روش‌های انگل شناسی کلاسیک به دنبال شناسایی لاروها از طریق کشت یا روش‌های مستقیم هنوز در بسیاری از آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود، پیچیدگی آن‌ها از نظر سختی و حساسیت نسبتاً کم آن‌ها، جای خود را به ادغام روش‌های تشخیصی جدید داده است. چندین روش ایمنی برای تشخیص آنتی‌بادی، به ویژه سنجش‌های ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISAs)، به‌طور فزاینده‌ای برای غلبه بر محدودیت‌های روش‌های انگل‌شناسی برای افزایش حساسیت تشخیصی و ساده‌سازی پردازش مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۵). در کیت‌های تجاری موجود برای الایزا عمدتاً از مجموعه آنتی ژن‌های تخلیص شده استفاده می‌شود. به این ترتیب کیفیت آنتی ژن‌ها در سری‌های مختلف تولید یکسان نخواهد بود و همین امر سبب می‌شود استانداردسازی تست، با مشکل مواجه شود. علاوه بر این فرایند تهیه آنتی‌ژن‌های طبیعی پر زحمت و پر هزینه است. این در حالی است که پیشرفت فناوری DNA نوترکیب امکان تولید آنتی‌ژن‌های نوترکیب را فراهم آورده است. تولید ارزان‌تر و استاندارد سازی ساده تر تست‌های تشخیصی از مهم‌ترین مزایای آنتی‌ژن‌های نوترکیب می‌باشد(۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

متاسفانه تست های الیزای متداول معمولا دارای حساسیت بالایی هستند اما اختصاصیت مناسبی ندارند که یکی از علل آن واکنش متقاطع آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در تست‌های الیزا با آنتی‌بادی‌های ساخته شده علیه سایر آنتی‌ژن‌ها می‌باشد(۷). کیت‌های تشخیصی ELISA براساس اپی‌توپ‌های منتخب سلول‌های B (مولتی اپی توپ)، رویکردهای جدید و کارآمدی برای تشخیص سرولوژیک بیماری‌های عفونی هستند. استفاده از آنتی ژن مولتی اپی‌توپ باعث افزایش چشمگیر حساسیت و اختصاصیت می‌شود. بهترین و کارآمدترین روش برای انتخاب اپی‌توپ‌های مناسب جهت طراحی سازه پروتئینی مولتی اپی‌توپ استفاده از روش بیوانفورماتیک و بیولوژی محاسباتی است(۸).

مطالعات نشان می‌دهد که بیوانفورماتیک با صرفه‌جویی در زمان، کاهش تعداد آزمایش‌ها و طراحی مولکول‌های بیولوژیکی جدید با ویژگی‌های مطلوب می‌تواند به مطالعات بیولوژیکی و پزشکی کمک کند. ایمونولوژی محاسباتی یک رشته جدید معرفی شده است که از علوم کامپیوتر در ایمونولوژی استفاده می‌کند. امروزه ایمونولوژی محاسباتی را می‌توان در زمینه‌های مختلفی از جمله شناسایی آنتی‌ژن‌های بالقوه، تخمین اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T و طراحی اشکال مختلف واکسن مورد استفاده قرار داد. استفاده از ابزارهای محاسباتی می‌تواند زمان و هزینه را در روش‌های آزمایشی کاهش دهد(۸). با توجه به مزایای ذکر شده در بالا، هدف از مطالعه حاضر طراحی بیوانفورماتیکی یک آنتی‌ژن نوترکیب مولتی اپی‌توپ منشا گرفته از دو آنتی‌ژن اصلی S.stercoralis برای تشخیص استرونژیلوئیدازیس انسانی بود.

طراحی مطالعه

در مطالعه حاضر ابتدا ۲ پروتئین با خاصیت آنتی‌ژنی از S. stercorali انتخاب شدند که در تصویر شماره ۱ نمایش داده شده‌اند. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، نواحی اپی‌توپیک سلول‌های B انتخاب شدند. اپی‌توپ‌های تعیین‌شده با استفاده از پیوند دهنده‌های اسید آمینه مناسب (EAAAK) به هم متصل شدند(تصویر شماره ۲) و مدل سه بعدی ساختار نهایی توسط ابزارهای بیوانفورماتیک ساخته و تأیید شد.

IgG immunoreactive antigen amino acid sequence (1-156)

Uniprot ID: O44394

NSARVENQDQKDQLENQDQKDQLENQDQKNQLKNQSENQDQKNQLKNQSENQDQKKPIKKPI
KKPGPKPIRPIVKPKPKTTTQAPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEGPEEPEGPAGPEEPEGPAGPEEPEGP
EEPEGPAGPEEPRDDDDGVDEEDERD

receptor protein-tyrosine kinase amino acid sequence (20-1426)

Uniprot ID: L7SX17

HINDTICAGVSIKFVLFEKFFFTHGTYYEKIQRCTVMEGDLVLAEPTIPEHLIKFPKLREITGSLFIY
GFHSINSLTNVFPKLAVIGGNSLIINYALIIHTCSNFSYIGIPSLKLIKKGGIRITNNDKICYTQTLDW
THITDGRTSNIIVEDSSKTRCPKFCKVENENVCHKKNDKIACWSKTKCQDKCDYIIDKGPGCTPN
GEKCHDLCVGGCSKPGDPAYCNSCRYTMHRDICVERCPKGFYNYMNHRCVTENECMNMRPYI
DIASGLNMLEEYKATDDGECTTKCPKNYEEDKGNPKKCIRCKGICLKRCISNVDIDSIASLERFKG
CQIVEGNFTLKLTVGTSDISPEKLEECLGEIETINGYLQIHFTPSVISLHMFKNLREIRGDFLHNNKY
ALVIEYNENLQTLFPGDGKNISIRNGNVTITNNIQLCENKARAFLQTVGKYYNNSEYLNALKTNG
ERAICNERLLNLSFVDKNVGLPNAFLNLQWDSLNTTEMDYRKFRAYQIFYKKVKDNTTKIDIFA
NRSACGDSWKSIIIEDTTHSGATIKNLEPYSWYAVYMETKVMPHNTAFKARSPVIIGRTGPGRPS
NVQNVIIKVSNSREMEIKWNPPAKPNGIIAYYEVSWKLIPHSLDTIEDDPCDTKAPSRRTEKYLPIQ
DKLLTPQSNSNNEGTCSAIQGCCKCTQERDEENIYSKQINTLSNDDKELENHEFQDKMQNLVWK
QRIKREARFIRTITSNPINIDKTVPEDSFGGLIEQLDAPTNYNDGGSIRINRTSNLQYTIKNLRHFGE
YYIVINVCLIGVYKAENEHDKNEQCCKNPFHTTKVTEKQLNFDKINKDSIFILNSTTEESNRVVTW
NNPTNPNGLVLGYKITLRNMDAEQTPLQQCISMSSLPIDAKGERVLPFANFTGLANGRYSISIRTIS
LAGLSDEVIYDNIFTISVSGLFTPMKIIIVVSFIIFILTLMILAIYWYFNRSFGRKVTEAIRQTISSNPE
YLSQFDVYQQDEWELKRNDVVLEEQIGSGTFGNVYKGYGNNVVAASGIKFGPCAIKTVRESASP
AEKLHFLFEASVMKKFHTSFIVKLYGVVSEGQPVLVVMEMMEKGNLRDFLRTHRPNSEDNVDN
KPVPSSQKLTNWAAQIADGMAYLESRKFCHRDLAARNCLVHRDETVKIGDFGMARDIYYHEYY
QPTGKRLIPVRWMAQESLKDGKFSIKSDIWSYGIVLYEMLTLAQQPYAGLDNPDVFEYIVNSRRI
LSRPQGCADFWYNTMKNCWRYNPSDRPSFFQILMRLEPYTTEDFKQQSFVINNYERLKNEHKLD
YEFDLSDDEDEEYEEEDEEIEEEEEEFEGENDSMLLDPNLSKSKTTGNHLEVINEDEKSEETVPTR
FKKQVRISDNSDKEQIELLTIENSDTVA

تصویر شماره ۱: توالی آمینواسیدی و کد uniprot آنتی ژن های مورد استفاده در این مطالعه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Amino acid sequence:

PAGPEEPRDDDDGVDEEAAAKLGYKITLRNMDAEQTPEAAAKPNGIIAYYEVSWKLIPEAAAKR
RTEKYLPIQDKLLTPEAAAKSCRYTMHRDICVERCPEAAAKCVGGCSKPGDPAYCNSHHHHHH

Nucleotide sequence:

CCGGCGGGCCCGGAAGAACCGCGCGATGATGATGATGGCGTGGATGAAGAAGCGGCGGCG
AAACTGGGCTATAAAATTACCCTGCGCAACATGGATGCGGAACAGACCCCGGAAGCGGCGG
CGAAACCGAACGGCATTATTGCGTATTATGAAGTGAGCTGGAAACTGATTCCGGAAGCGGC
GGCGAAACGCCGCACCGAAAAATATCTGCCGATTCAGGATAAACTGCTGACCCCGGAAGCG
GCGGCGAAAAGCTGCCGCTATACCATGCATCGCGATATTTGCGTGGAACGCTGCCCGGAAG
CGGCGGCGAAATGCGTGGGCGGCTGCAGCAAACCGGGCGATCCGGCGTATTGCAACAGCCA
TCATCATCATCATCAT

تصویر شماره ۲: توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی سازه طراحی شده. سبز: اپی توپ انتخاب شده از آنتی ژن IgG immunoreactive antigen. آبی: اپی توپ های انتخاب شده از آنتی ژن receptor protein-tyrosine kinase. قرمز: لینکر. نارنجی: his tag

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلول B

اپی‌توپ‌ها مناطقی از آنتی‌ژن هستند که توسط ناحیه پاراتوپ ایمونوگلوبولین شناسایی می‌شوند. اپی توپ خطی یک توالی اسید آمینه پیوسته است. اپی توپ ساختاری متشکل از اسیدهای آمینه است که ممکن است در یک توالی نباشند اما در یک ساختار سه بعدی در نزدیکی یکدیگر قرار دارند. یک مرحله حیاتی در طراحی یک پروتئین چند اپی توپی برای تولید واکسن یا ساخت یک آزمایش سرولوژیکی، پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول B است. بنابراین، روش‌های بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی در پروتئین‌ها مطلوب هستند. علاوه بر این، رویکردهای بیوانفورماتیکی می‌توانند روش‌های صرفه‌جویی در زمان و هزینه را برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های احتمالی سلول B در پروتئین هدف فراهم کنند. اپی‌توپ‌های سلول B خطی نیز توسط ابزار ABCPred پایگاه داده اپی‌توپ ایمنی (موجود در http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred) با تنظیمات پیش‌فرض تخمین زده می‌شود. بهترین پیش‌بینی‌ها توسط ABCPred زمانی اتفاق می‌افتد که پپتید ۱۶ مر تنظیم شود. سرور ABCPred می‌تواند اپی توپ‌های سلول B را در پروتئین‌ها از طریق شبکه‌های عصبی مصنوعی تعریف کند. علاوه بر این، ABCPred نرم‌افزار آنلاین اولیه است که بر اساس شبکه عصبی مکرر توسط الگوهای طول ثابت با دقت ۶۵/۹۳ درصد ایجاد شده است.

طراحی سازه پروتئینی

اپی‌توپ‌های سلول‌های B که توسط سرورهای ذکر شده انتخاب شده بودند از طریق پیوند دهنده‌های اسید آمینه مناسب ادغام شدند. در نهایت، یک ساختار اسید آمینه براساس یک رویکرد چند اپی توپ ساخته شد.

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

پایداری و کارایی یک ساختار پروتئینی در یک سیستم بیولوژیکی به خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها مربوط می‌شود. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی از جمله توالی اسید آمینه، ضریب خاموشی، شاخص ناپایداری، میانگین کل شاخص هیدروپاتیک (GRAVY)، شاخص آلیفاتیک، نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی می‌تواند به پیش‌بینی پایداری، فعالیت و ویژگی‌های کلی پروتئین کمک کند. نرم‌افزارهای آنلاین مختلفی وجود دارند که می‌توانند ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی یک پروتئین معین را پیش‌بینی کنند.

ابزار ProtParam (موجود در http://web.expasy.org/Protparam) یک نرم‌افزار آنلاین در سرور ExPASy است که در مطالعه حاضر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

برای تجزیه و تحلیل خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف ساختار طراحی شده، بر اساس توالی اسید آمینه آن استفاده شد.

پیش بینی خاصیت آنتی ژنی

سرور EMBOSS (موجود در http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic) برای پیش‌بینی ویژگی‌های آنتی‌ژنی پروتئین‌ها استفاده شد. EMBOSS دارای الگوریتمی است که شامل چندین برنامه برای آنالیزهای مختلف چون، هم ترازی توالی‌ها، جستجو در پایگاه‌های داده، تشخیص نقوش در پروتئین‌ها، پیش‌بینی الگوها در توالی‌های نوکلئوتیدی، و تجزیه و تحلیل استفاده از کدون، می‌باشد. هم‌چنین، قسمت‌های آنتی‌ژنی پروتئین‌ها را باتوجه به خواص فیزیکی شیمیایی، ترکیب اسید آمینه و افزونگی اپی‌توپ شناسایی می‌کند.

ساخت مدل سه بعدی برای سازه طراحی شده

ساختارهای سه بعدی پروتئین‌ها می‌توانند به پیش‌بینی عملکرد پروتئین کمک‌کنند و اطلاعات مفیدی را برای طراحی مولکول‌های تنظیم‌کننده که می‌توانند عملکرد پروتئین‌ها را تنظیم کنند، ارائه دهند. در این مطالعه برای ساختار سه بعدی سازه، GalaxyTBM (مدل‌سازی مبتنی بر الگو، موجود در http://galaxy.seoklab.org) استفاده شد. مدل‌سازی مبتنی بر الگو شامل مراحل، پذیرش پروتئین‌های همولوگ با ساختارهای تجربی تعریف شده به عنوان الگو، هم ترازی دنباله‌ها و الگوهای هدف، ساخت مدل سه بعدی براساس تراز و اصلاح مدل‌ها، می‌باشد. مدل ساخته شده با استفاده از نرم‌افزار آنلاین GalaxyRefine بهینه‌سازی شد.

اعتبار سنجی ساختار سوم پیش‌بینی شده

یک گام مهم برای کشف فرآیندهای بیولوژیکی در سطح مولکولی، در دسترس بودن مدل ساختاری پروتئین است. پس از پردازش، آماده سازی و بررسی مدل سه بعدی با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین مانند ProSA و PROCHECK، کیفیت و قابلیت اطمینان مدل ساخته شده مورد ارزیابی قرار گرفت. یک نرم‌افزار آنلاین حیاتی که برای بررسی مدل‌های سه بعدی پروتئین از نظر خطاهای احتمالی استفاده می‌شود، ProSA (http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) است. این ابزار در تشخیص ساختارهای تجربی شناسایی شده، مدل‌های نظری و مهندسی پروتئین استفاده می‌شود. z-score این سرور می‌تواند کیفیت مدل‌های سه بعدی را تعیین کند. نمره کیفیت کل ارزیابی شده توسط ProSA برای یک ساختار ورودی مشخص در نموداری نشان داده شده است که نمرات تمام زنجیره‌های پروتئینی تعریف شده تجربی موجود در بانک داده پروتئین (PDB) را نشان می‌دهد. این ویژگی امتیاز یک مدل خاص را با امتیازات محاسبه شده از تمام ساختارهای تعریف شده که در PDB ذخیره شده‌اند، مقایسه می‌کند. علاوه بر این، کیفیت مدل‌های تولید شده با PROCHECK توسط طرح Ramachandran (موجود در http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار راماچاندران هر جفت زاویه (φ, ψ) را در ساختار سه بعدی پروتئین مشخص شده به روش منطقی ساده نشان می‌دهد. نمودار راماچاندران مدت‌هاست که در هر مرحله از کریستالوگرافی و مدل‌سازی پروتئین برای شناسایی زوایای پیچش زنجیره اصلی (φ, W) استفاده می‌شود.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای ارزیابی پایداری ساختار پروتئین طراحی شده استفاده شد. برای این منظور از بسته‌ی نرم‌افزاری گرومکس(GROMACS) ۲۰۱۸ و میدان نیروی OPLS-AA استفاده شد(۹). پروتئین طراحی شده در یک کادر دارای سه محور قرار داده شدند که از تمام لبه‌ها ۱ نانومتر فاصله داشت. پس

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

از آن، ساختار پروتئین وارد یک محفظه‌ی شبیه‌سازی شدند که با مولکول‌های آب TIP3P پر شده بود. محفظه شبیه‌سازی با تعداد مناسبی از یون‌های Na^+ و Cl^- خنثی شد. فرآیند کمینه‌سازی انرژی برای کمپلکس‌های شبیه‌سازی شده دو بخش بود. در بخش اول، سیستم‌ها با استفاده از NVT (تعداد ذرات، حجم و دمای ثابت) در ۳۰۰K و ۱۰۰ ps به تعادل رسیدند و در بخش دوم، سیستم به تعادل رسید تا به دما و فشار مورد نظر دست پیدا کند. NPT (تعداد ذرات، فشار و دمای ثابت) در K ۳۰۰ و ۱/۰ بار و ظرف ۱۰۰ ps با استفاده از یک باروستات پارینلو-رحمان (Parrinello-Rahman) به تعادل رسید. برای پرداختن به بارهای الکترواستاتیک دوربرد، از الگوریتم ذرات مش اوالد (Particle Mesh Ewald: PME) استفاده شد و فاصله‌ی عدم تأثیرگذار آن ۱۰ آنگستروم در نظر گرفته شد. از فاصله‌ی عدم تأثیرگذاری ۱ نانومتری برای محاسبه‌ی برهم‌کنش‌های واندروالس (Van Der Waals: VDW) استفاده شد. برای محدود کردن طول پیوندهای کووالانسی از الگوریتم محدودیت خطی استفاده شد. پس از اعمال تعادل‌های لازم، شبیه‌سازی تا ۱۰۰ نانوثانیه برای بررسی پایداری ساختار پروتئین اجرا شد.

یافته‌ها

بازیابی توالی، تعریف اپی‌توپ‌های خطی سلول B و طراحی سازه مولتی اپی توپ

توالی اسیدهای آمینه آنتی ژن‌های IgG immunoreactive antigen و receptor protein-tyrosine kinase در قالب FASTA از پایگاه داده Uniprot به‌دست آمد. براساس آنالیزهای ABCPred، اپی‌توپ‌های خطی هر آنتی‌ژن پیش‌بینی شد. بنابراین، توالی اپی‌توپ برای هر یک از آنتی‌ژن‌ها، همراه با اسیدهای آمینه اولیه و پایانی آن‌ها، تعداد اسیدهای آمینه و امتیاز هر دنباله در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در مرحله آخر، پروتئین چند اپی‌توپی با استفاده از پیوندهای مناسب بین مناطق انتخاب شده طراحی شد. مناطق انتخابی اپی توپ سلول B آنتی‌ژن‌های مدنظر، نشان داده شده در جدول شماره ۱، از طریق پیوند دهنده‌های EAAAK متصل شدند و ساختار چند اپی‌توپی طراحی شد.

جدول شماره ۱: اپی‌توپ‌های سلول B انتخاب شده از آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار ABCpred.

توالی آمینواسیدی اپی توپ	محل شروع اپی‌توپ	آنتی ژن
PAGPEEPRDDDDGVDE	۱۳۶	IgG immunoreactive
LGYKITLRNMDAEQTP	۸۶۸	receptor protein-tyrosine kinase
PNGIIAYYEVSWKLIP	۶۱۷	
RRTEKYLPIQDKLLTP	۶۵۰	
SCRYTMHRDICVERCP	۲۲۵	
CVGGCSKPGDPAYCNS	۲۱۰	

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ساختار طراحی شده توسط ProtParam محاسبه شد. وزن مولکولی (MW) و مقدار pI پروتئین طراحی شده حدود ۱۴ کیلو دالتون و ۵/۹۷ بود. مقدار pI ماهیت اسیدی پروتئین را نشان داد. هم‌چنین این سازه از ۱۲۷اسید آمینه تشکیل شده است. شاخص ناپایداری (II) برابر با ۳۹/۸۵ بود که نشان داد ساختار می‌تواند به‌عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته شود. شاخص آلیفاتیک و مقدار GRAVY به صورت ۶۰/۹۴ و ۰/۷۸۸- محاسبه شد که نشان‌دهنده ماهیت آبدوست سازه است و نشان می‌دهد که پروتئین می‌تواند با مولکول‌های آب برهمکنش داشته باشد.

ساخت و اعتبارسنجی مدل سه بعدی

با GalaxyTBM پنج ساختار سه بعدی ایجاد شد. سپس از سرورهای طرح پلات ProSA و Ramachandran برای تجزیه و تحلیل کیفیت مدل‌های سوم و انتخاب بهترین آن‌ها استفاده گردید (تصویر شماره ۳).

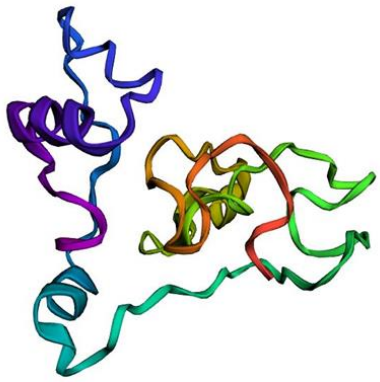
ProSA نمره کیفیت کل (امتیاز z) پروتئین را محاسبه می‌کند و آن را باساختارهای تجربی تعریف شده پروتئین‌ها در اندازه یکسان با توجه به نتایج PDB مقایسه می‌کند. مقادیر مثبت مشکل را در مدل‌های سه بعدی ایجاد شده نشان می‌دهد و بالاترین نمره z منفی نشان‌دهنده بالاترین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

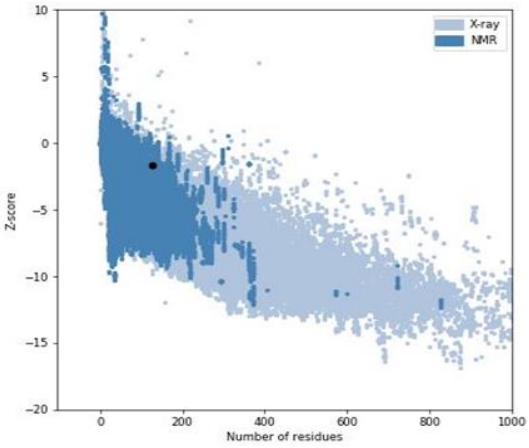
کیفیت ساختار سوم سازه طراحی شده است. نمره z برای مدل شاخته شده ۱/۶۱- بود و در ناحیه تعیین ساختار شده پروتئین‌های طبیعی قرار داشت (تصویر شماره ۴). نمودار راماچاندران نشان داد که ۸۶/۱، ۱۳/۹ و ۰/۰ درصد از بقایای اسید آمینه به ترتیب در منطقه مطلوب، منطقه مجاز و منطقه دورتر قرار دارند (تصویر شماره ۵).

نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی

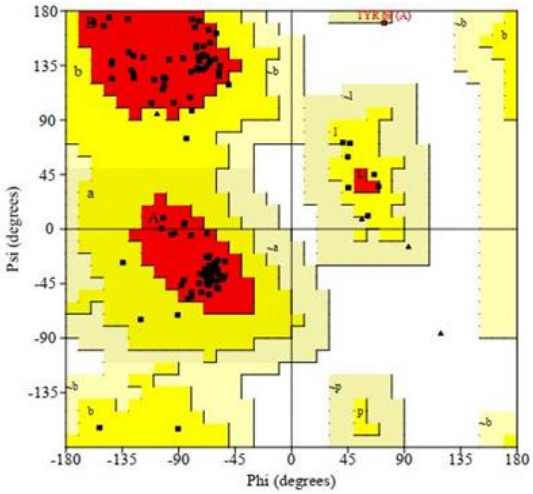
برای بررسی پایداری ساختار پروتئین طراحی شده، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تا ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. پارامتر RMSD در آنالیز نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین‌ها برای ارزیابی پایداری ساختار، انحراف و کانفورماسیون‌های پروتئین یا کمپلکس در طول دوره زمانی شبیه‌سازی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار RMSD کم‌تر نشان دهنده پایداری بیش‌تر و نوسانات کم‌تر در طول شبیه‌سازی است. آنالیز نتایج مربوط به RMSD پروتئین طراحی شده نشان داد که پروتئین طراحی شده از حدود ۲۰ نانوسکند به پایداری رسیده و میانگین RMSD آن ۰/۵۹ نانومتر است (تصویر شماره ۶). این پایداری در طول شبیه‌سازی تا ۱۰۰ نانوثانیه حفظ شده است. از آنجایی که نوسانات در مدت زمان ۲۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه کم‌تر از ۰/۳ نانومتر بوده است ساختار پروتئین طراحی شده پایدار می‌باشد.



تصویر شماره ۳: تصویر از مدل سه بعدی ساخته شده برای پروتئین طراحی شده توسط نرم‌افزار آنلاین SAVES v6.0. سمت چپ آبی رنگ انتهای N و سمت راست تصویر سبز رنگ انتهای C می‌باشد.



تصویر شماره۴: نمره Z برای مدل سه بعدی ساخته شده. همان‌گونه‌که مشاهده می‌شود نقطه سیاه که نمره مدل سه بعدی ساخته شده می‌باشد در ناحیه آبی پر رنگ یعنی ناحیه نمره‌های ساختارهای طبیعی قرار گرفته است.

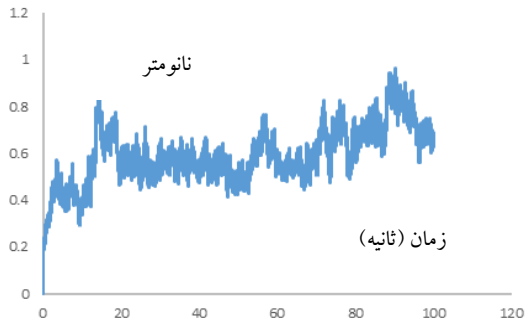


تصویر شماره ۵: نمودار راماچاندران برای مدل سه بعدی ساخته شده. همان طور که مشاهده می شود اکثریت زوایای پیوندی مدل ساخته شده در نواحی مجاز نمودار راماچاندران قرار می گیرند.

بحث

امروزه الایزا و روش‌های مرتبط با آن به‌دلیل هزینه کم، استفاده آسان، نتایج کم‌تر متغیر و سهولت اتوماسیون معمولاً از آزمایش‌های سرولوژیکی استفاده می‌شوند. با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، می‌توان تمام آنتی‌ژن‌های پروتئینی را به راحتی تولید و برای طراحی کیت الایزا به کار برد(۱۰).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



تصویر شماره ۶: نتایج RMSD پروتئین طراحی شده. این نتایج نشان می‌دهد که پایداری پروتئین در طول شبیه سازی تا ۱۰۰ نانوثانیه حفظ شده است

امروزه ابزارها و رویکردهای بیوانفورماتیک به طراحی مولکول‌های پروتئینی با ویژگی‌های مطلوب و مناسب کمک می‌کند(۱۱). بنابراین، ابزارهای بیوانفورماتیک آنلاین برای طراحی یک پروتئین چند اپی‌توپی برای تشخیص استرونژیلوئیدازیس، براساس اپی‌توپ‌های خطی سلول B آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن‌های IgG immunoreactive antigen و receptor protein- tyrosine kinase استفاده شد. طراحی لینکر یک اصل بسیار مهم و اساسی در ساخت پروتئین‌های چند دامنه‌ای طراحی شده de novo است. کنترل فاصله و جهت‌گیری دامنه‌ها به منظور به حداکثر رساندن عملکرد پروتئین مورد نظر یک کار دشوار در مهندسی پروتئین است. در سال ۲۰۰۱، Arai و همکاران یک پیوند دهنده مناسب را مهندسی و طراحی کردند که هدف آن ایجاد ثبات منطقی، انعطاف‌پذیری و فاصله بین دامنه‌های یک پروتئین همجوشی چند منظوره بود. نشان داده شده است که لینکرهای مارپیچ EAAAK می‌توانند به‌طور موثر دامنه‌های پروتئین فیوژن را از هم جدا کنند و فاصله بین دامنه‌ها را می‌توان با تغییر موتیف های اتصال EAAAK کنترل کرد. بنابراین، پتانسیل بالای لینکرهای مارپیچ در مهندسی پروتئین و طراحی پروتئین‌های همجوشی چند منظوره مفید نشان داده شد(۱۲). مناطق انتخاب شده از اپی‌توپ‌های سلول B خطی از طریق پیوند دهنده EAAAK ادغام شدند و یک ساختار چند اپی‌توپی جدید ساخته شد. برای تثبیت فاصله بین حوزه‌های عملکردی و تشدید بیان محصول نهایی در میزبان باکتریایی، پیوند مارپیچی EAAAK با پشتیبانی از پل نمکی Glu-Lys یک ساختار منسجم ایجاد کرد(۱۴،۱۳). عدم وجود پیوندهای بین اپی‌توپ‌ها منجر به تولید اپی‌توپ‌های متصل و اختلال در عملکرد پروتئین می شود(۱۵). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سازه طراحی‌شده نیز از طریق ابزار بیوانفورماتیک پیش‌بینی شد. این سازه براساس امتیاز GRAVY ۰/۷۸۸- آبدوست بود که برهمکنش آسان آن را با مولکول‌های آب نشان می‌دهد. مقدار ۵/۰۵pI ویژگی اسیدی پروتئین طراحی شده را نشان داد. علاوه بر این، شاخص آلیفاتیک بالا ۶۰/۹۴ نشان داد که پروتئین طراحی شده می‌تواند پایدارتر در برابر حرارت باشد و هم‌چنین مقدار شاخص ناپایداری ۳۹/۸۵ نشان داد که سازه طراحی شده می‌تواند پایدار باشد. ساخت و اعتبارسنجی مدل سه بعدی می‌تواند افقی را برای شناسایی ساختار پروتئین‌ها باز کند. به همین دلیل، مدل سه بعدی از سازه توسط GalaxyTBM ساخته شد. در مطالعه حاضر، اپی‌توپ‌های خطی B خطی از دو آنتی‌ژن S. stercoralis پیش‌بینی و از طریق پیوندهای مناسب به یکدیگر متصل شدند. بررسی ساختارهای فیزیکوشیمیایی سازه پروتئینی طراحی شده نشان داد که ساختار مقاوم در برابر حرارت، آبدوست و اسیدی است. در نهایت، مشخص شد که پروتئین کایمریک طراحی شده می‌تواند تا حد زیادی در E. coli بیان شود. پروتئین طراحی شده را می‌توان در ساخت یک آزمایش سرولوژیکی با کارایی بالا برای تشخیص استرونژیلوئیدازیس انسانی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی بهبهان انجام شد (کد طرح: ۴۰۲۰۳۴).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

References

1. Paltridge M, Traves A. The health effects of strongyloidiasis on pregnant women and children: a systematic literature review. Trop Med Infect Dis 2018; 3(2): 50.
2. Yeung S, Bharwada Y, Bhasker S, Boggild A. Strongyloidiasis: what every gastroenterologist needs to know. Ther Adv Chronic Dis 2022; 13: 20406223221137499.
3. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by Strongyloides stercoralis. Curr Opin Infect Dis 2012; 25(4): 458-463.
4. Wikman-Jorgensen P, Requena-Méndez A, Llenas-García J. A Review on Strongyloidiasis in Pregnant Women. Res Rep Trop Med 2021; 12: 219-225.
5. Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis: a neglected tropical disease. Infect Dis Clin 2019; 33(1): 135-151.
6. Ferra B, Holec-Gąsior L, Kur J. Serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. Parasitol Int 2015; 64(5): 288-294.
7. Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis. Clin Microbiol Rev 2019; 33(1): e00073-19.
8. Movahedpour A, Mostafavi-Pour Z, Sarkari B, Taheri-Anganeh M, Nezafat N, Savardashtaki A, et al. Designing a Multi-Epitope Antigen for Serodiagnosis of Strongyloides stercoralis Based on L3Nie. 01 and IgG Immunoreactive Epitopes. Avicenna J Med Biotechnol 2022; 14(2): 114-124.
9. Ahmad S, Ranaghan KE, Azam SS. Combating tigecycline resistant Acinetobacter baumannii: A leap forward towards multi-epitope based vaccine discovery. Eur J Pharm Sci 2019; 132: 1-17.
10. Khatami SH, Taheri-Anganeh M, Movahedpour A, Savardashtaki A ,Ramezani A, Sarkari B, et al. Serodiagnosis of human cystic echinococcosis based on recombinant antigens B8/1 and B8/2 of Echinococcus granulosus. J Immunoassay Immunochem 2020; 41(6): 1010-1020.
11. Khatami SH, Taheri-Anganeh M, Arianfar F , Savardashtaki A, Sarkari B, Ghasemi Y, et al. Analyzing signal peptides for secretory production of recombinant diagnostic antigen B8/1 from Echinococcus granulosus: an in silico approach. Mol Biol Res Commun 2020; 9(1): 1-10.
12. Arai R, Ueda H, Kitayama A, Kamiya N, Nagamune T. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. Protein Eng 2001; 14(8): 529-532.
13. Partovi Nasr M, Motalebi M, Zamani MR, Jourabchi E. In silico analysis and expression of osmotin-EAAAK-LTP fused protein. J Genet Resour 2020; 6(1): 41-48.
14. Vakili B, Eslami M, Hatam GR, Zare B, Erfani N, Nezafat N, et al. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against Leishmania infantum. Int J Biol Macromol 2018; 120 (Pt A): 1127-1139.
15. Khan M, Khan S, Ali A, Akbar H, Sayaf AM, Khan A, et al. Immunoinformatics approaches to explore Helicobacter Pylori proteome (Virulence Factors) to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine. Scientific Reports 2019; 9(1): 1-13.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]