

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

Sonia Sadeghpour¹,
Hojat Ghasemnejad- Berenji²,
Yalda Malekzadegan³,
Sahar Rezaei Arablouydareh⁴,
Mohammadreza Pashaei⁵,
Javad Fathi⁶,
Yousof Karmali⁷,
Mohamad Sabaghan⁸,
Mortaza Taheri-Anganeh⁹

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, bioinformatics

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)

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

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

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص سرولولژیکی (*S. stercoralis*) *Strongyloides 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 می تواند بر نازایی هم موثر باشد، آزمایش های سرولولژیکی جدید با کارایی بالا معرفی شوند. این مطالعه با هدف، طراحی یک ساختار چند اپی توپی برای تشخیص *S. stercoralis* انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر یک مطالعه ایمونوانفورماتیک محاسباتی می باشد. برای هدف این مطالعه، ابتدا بخش های بسیار آنتی ژنیک و اپی توپ های بالقوه ایمنی غالب *S. stercoralis* از دو پروتئین آنتی ژنیک شناسایی شدند و سپس تمام قسمت های انتخاب شده توسط یک پیونددهنده مناسب به هم متصل شدند. در ادامه، ویژگی های فیزیوشیمیایی سازه طراحی شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس سازه های ثالثی سازه ساخته و مورد ارزیابی قرار گرفتند تا بهترین آن ها مشخص شود.

یافته ها: ارزیابی بیوانفورماتیک نشان داد که ساختار پروتئینی طراحی شده می تواند آبدوست، پایدار در برابر حرارت و اسیدی باشد. هم چنین مدل سه بعدی ساخته شده مشابه ساختار پروتئین های طبیعی بود.

استنتاج: با توجه به نتایج مطالعه، سازه طراحی شده می تواند به عنوان یک آنتی ژن کارآمد در سیستم ELISA برای تشخیص سرولولژیک استرونتیلوئیدازیس انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتی ژن، آنتی بادی، تشخیص سرولولژیک، بیوانفورماتیک

مؤلف 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 ارشد، 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، 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

مقدمه

استرونیلوئیدازیس 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 هج 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 استرونیلوئید ممکن است در بیمارانی که نقص ایمنی دارند، رخ دهد. در حالی که علائم بالینی کولیت حاصل از *Strongyloides* ممکن است به طور قابل توجهی با بیماری‌های التهابی روده (Inflammatory bowel disease) همپوشانی داشته باشد، یافته‌های آندوسکوپی یا بافت شناسی نیز ممکن است دچار خطا باشد (۲). استرونیلوئیدازیس 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 استرونیلوئید- 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 استرونیلوئیدازیس در دوران بارداری وجود دارد. اگرچه داده‌ها کمیاب است اما عفونت این انگل با ناتوانی‌های رشدی و کم‌خونی در دوران بارداری همراه است، هم‌چنین عفونت بیش از حد ممکن است باعث مرگ مادر و نوزاد شود. استرونیلوئیدازیس 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 برونکوالوئولار 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 ایمونوسوربت مرتبط با آنزیم (ELISAs)، به‌طور فزاینده‌ای برای غلبه بر محدودیت‌های روش‌های انگل شناسی برای افزایش حساسیت تشخیصی و ساده‌سازی پردازش مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵). در کیت‌های تجاری موجود برای الایزا عمدتاً از مجموعه آنتی‌ژن‌های تخلیص شده استفاده می‌شود. به این ترتیب کیفیت آنتی‌ژن‌ها 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 پرهزینه است. این در حالی است که پیشرفت فناوری DNA نو ترکیب امکان تولید آنتی‌ژن‌های نو ترکیب را فراهم آورده است. تولید ارزان‌تر و استاندارد سازی ساده تر تست‌های تشخیصی از مهم‌ترین مزایای آنتی‌ژن‌های نو ترکیب می‌باشد (۶).

متاسفانه تست های الیزای متداول معمولاً دارای حساسیت بالایی هستند اما اختصاصیت مناسبی ندارند که یکی از علل آن واکنش متقاطع آنتی ژن های مورد استفاده در تست های الیزا با آنتی بادی های ساخته شده علیه سایر آنتی ژن ها می باشد (۷). کیت های تشخیصی ELISA براساس اپی توپ های منتخب سلول های B (مولتی اپی توپ)، رویکردهای جدید و کارآمدی برای تشخیص سرولوژیک بیماری های عفونی هستند. استفاده از آنتی ژن مولتی اپی توپ باعث افزایش چشمگیر حساسیت و اختصاصیت می شود. بهترین و کارآمدترین روش برای انتخاب اپی توپ های مناسب جهت طراحی سازه پروتئینی مولتی اپی توپ استفاده از روش بیوانفورماتیک و بیولوژی محاسباتی است (۸).

مطالعات نشان می دهد که بیوانفورماتیک با صرفه جویی در زمان، کاهش تعداد آزمایش ها و طراحی مولکول های بیولوژیکی جدید با ویژگی های مطلوب می تواند به مطالعات بیولوژیکی و پزشکی کمک کند. ایمونولوژی محاسباتی یک رشته جدید معرفی شده است که از علوم کامپیوتر در ایمونولوژی استفاده می کند.

امروزه ایمونولوژی محاسباتی را می توان در زمینه های مختلفی از جمله شناسایی آنتی ژن های بالقوه، تخمین اپی توپ های سلول های B و T و طراحی اشکال مختلف واکسن مورد استفاده قرار داد. استفاده از ابزارهای محاسباتی می تواند زمان و هزینه را در روش های آزمایشی کاهش دهد (۸). با توجه به مزایای ذکر شده در بالا، هدف از مطالعه حاضر طراحی بیوانفورماتیک یک آنتی ژن نو ترکیب مولتی اپی توپ منشا گرفته از دو آنتی ژن اصلی *S. stercoralis* برای تشخیص استروئیلوئیدازیس انسانی بود.

طراحی مطالعه

در مطالعه حاضر ابتدا ۲ پروتئین با خاصیت آنتی ژنی از *S. stercoralis* انتخاب شدند که در تصویر شماره ۱ نمایش داده شده اند. سپس با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک، نواحی اپی توپیک سلول های B انتخاب شدند. اپی توپ های تعیین شده با استفاده از پیوند دهنده های 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

NSARVENQDQKDQLENQDQKDQLENQDQKNQKNQSENQDQKNQKNQSENQDQKKPIKPKPI
KKPGPKPIRPIVKPKPKTTTQAPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEEPEGPEE
EEPEGPEEPRDDDDGVDEEDERD

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

Uniprot ID: L7SX17

HINDTICAGVSIKFLVFEKFFFTHGTYEYKIQRCCTVMEGDLVLAETIPEHLIKFKPKLREITGSLFIY
GFHSINSLTNVFPKLAVIGGNSLIINYALIIHTCSNFSYIGIPSLKLIKGGIRITNNDKICYTQTLDW
THITDGRSTNIIVEDSSKTRCPKFKVENENVCHKKNDKIAWSTKQCDKCDYIIDKGPCTPN
GEKCHDLVGGGCKPGDPA YCNSCRYTMHRDICVERCPKGFYNYMNHRCVTENECMNMRPYI
DIASGLNMLEEYKATDDGECTTKCPKNYEEDKGNPKKCIRCKGICLKRCISNVDDISASLERFKG
CQIVEGNFTLKLTVGTSDISPEKLEECLEIETINGYLQIHFTPSVISLHMFKNLREIRGDFLHNNKY
ALVIEYNENLQTLFPGDGKNISIRNGNVTTNNIQLCENKARAFQTVGKYNNSEYLNALKTNG
ERAICNERLLNLSFVDKNVGLPNAFLNLQWDSLNTTEM DYRKFRAYQIFYKKVKDNTTKIDIFA
NRSACGDSWKSIIIDTTHSGATIKNLEPSWYAVVYMETKVMPHNTAFKARSPVIGRTGPGRPS
NVQNVIIKVSNSREMEIKWNPPAKPNGIIAYYEVSWKLIPHSLDTIEDDPDCTKAPSRRTKYLPIQ
DKLLTPQSNNSNEGTCASIQGCKCTQERDEENIYSKQINTLSNDDKELENHEFQDKMQNLVWK
QRIKREARFIRITTSNPINIDKTVPEDSFGGLIEQLDAPTNYNDGGSIRINRTSNLQYTIKLNLRHFGE
YYIVINVCLIGVYKAENEHDKNEQCKKNPFHTTKVTEKQLNFDKINKDSIFILNSTTEESNRVVTW
NNPTNPNGLVGYKITLRNMDAEQTPLQQCISMSSLPIDAKGERVLPFANFTGLANGRYISIRITIS
LAGLSDEVYDNIFTISVSGLFTPMKIIIVVSFIIFILTLMLAIYWFNRSFGRKVTEAIRQTISNPE
YLSQFDVYQQDEWELKRNDDVLEEIQSGTGFNGVYKGYGNVVAASGKIFGPKCAIKTVRESASP
AEKHLHFLFEASVMKKFHTSFIVKLYGVVSEGOQPVLVVMMMEKGNLRDLRTHRPNSDNDVN
KPVPSQKL TNWAAQIADGMAYLESRKFCRDLAARNCLVHRDET VKIGDFGMARDIYYHEYY
QPTGKRLIPVRWMAQESLKDGFSGKSDIWSYGIVLYEMLTLAQQPYAGLDNPDVFEYIVNSRRI
LSRPQGCADF WYNTMKNCWRYNPSDRPSFFQILMRLEPYTTEDFKQSFVINRYRLKNEHKLD
YEFDLSDDEDEEYEEDEEIEEEIEEEFEENDSMLLDPNLSKSKTTGNHLEVINEDEKSEETVPTR
FKKQVRISDNSDKEQIELLTIENSDTVA

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

Amino acid sequence:

PAGPEERDDDDGVDEEAAAKLGYSKITLRNMDAEQTPEAAAKPNGIIAYYEVSWKLIPEAAAKR
RTEKYLPIQDKLLTPEAAAKSCRYTMHRDICVERCPEAAAKCVGGCSKPGDPAYCNSHHHHHH

Nucleotide sequence:

CCGCGCGGGCCCGGAAGAACCGCGGATGATGATGATGGCGTGGATGAAGAAGCGGCGCGG
AAACTGGGCTATAAAATTACCCTGCGCAACATGGATGCGGAACAGACCCCGGAAGCGGCGG
CGAAACCGAACGCGCATTATTGCGTATTATGAAGTGAGCTGGAACTGATTCCGGAAGCGGC
GGCGAAACGCCGACCGAAAAATATCTGCCGATTGAGGATAAACTGCTGACCCCGGAAGCG
GCGGCGAAAAGCTGCCGCTATACCATGCATCGCGATATTGCGTGGAAACGCTGCCCGGAAG
CGGCGGCGAAAATGCGTGGGCGGCTGCAGCAACCGGCGCGATCCGGCGTATTGCAACAGCCA
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

مکرر توسط الگوهای طول ثابت با دقت ۶۵/۹۳ درصد
ایجاد شده است.

طراحی سازه پروتئینی

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

ارزیابی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی

پایداری و کارایی یک ساختار پروتئینی در یک سیستم بیولوژیکی به خواص فیزیکی و شیمیایی آن ها مربوط می شود. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی متعددی از جمله توالی اسید آمینه، ضریب خاموشی، شاخص ناپایداری، میانگین کل شاخص هیدروپاتیک (GRAVY)، شاخص آلفاتیک، نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی می تواند به پیش بینی پایداری، فعالیت و ویژگی های کلی پروتئین کمک کند. نرم افزارهای آنلاین مختلفی وجود دارند که می توانند ویژگی های فیزیکی و شیمیایی یک پروتئین معین را پیش بینی کنند.

ابزار ProtParam (موجود در <http://web.expasy.org/ProtParam>) یک نرم افزار آنلاین در سرور ExPASy است که در مطالعه حاضر

پیش بینی اپی توپ های خطی سلول B

اپی توپ ها مناطقی از آنتی ژن هستند که توسط ناحیه پاراتوپ ایمونوگلوبولین شناسایی می شوند. 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، پیش بینی اپی توپ های سلول B است. بنابراین، روش های بیوانفورماتیک برای پیش بینی اپی توپ های سلول B خطی در پروتئین ها مطلوب هستند. علاوه بر این، رویکردهای بیوانفورماتیکی می توانند روش های صرفه جویی در زمان و هزینه را برای پیش بینی اپی توپ های احتمالی سلول B در پروتئین هدف فراهم کنند. اپی توپ های سلول B خطی نیز توسط ابزار ABCPred پایگاه داده اپی توپ ایمنی (موجود در <http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred>) با تنظیمات پیش فرض تخمین زده می شود. بهترین پیش بینی ها توسط ABCPred زمانی اتفاق می افتد که پپتید ۱۶ مر تنظیم شود. سرور ABCPred می تواند اپی توپ های سلول B را در پروتئین ها از طریق شبکه های عصبی مصنوعی تعریف کند. علاوه بر این، ABCPred نرم افزار آنلاین اولیه است که بر اساس شبکه عصبی

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 EMBOS (موجود در <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>) برای پیش بینی ویژگی های آنتی ژنی پروتئین ها استفاده شد. EMBOS دارای الگوریتمی است که شامل چندین برنامه برای آنالیزهای مختلف چون، هم ترازی توالی ها، جستجو در پایگاه های داده، تشخیص نقوش در پروتئین ها، پیش بینی الگوها در توالی های نوکلئوتیدی، و تجزیه و تحلیل استفاده از کدون، می باشد. همچنین، قسمت های آنتی ژنی پروتئین ها را با توجه به خواص فیزیکی شیمیایی، ترکیب اسید آمینه و افزونگی اپی توپ شناسایی می کند.

ساخت مدل سه بعدی برای سازه طراحی شده

ساختارهای سه بعدی پروتئین ها می توانند به پیش بینی عملکرد پروتئین کمک کنند و اطلاعات مفیدی را برای طراحی مولکول های تنظیم کننده که می توانند عملکرد پروتئین ها را تنظیم کنند، ارائه دهند. در این مطالعه برای ساختار سه بعدی سازه، GalaxyTBM (مدل سازی مبتنی بر الگو، موجود در <http://galaxy.seoklab.org>) استفاده شد. مدل سازی مبتنی بر الگو شامل مراحل، پذیرش پروتئین های همولوگ با ساختارهای تجربی تعریف شده به عنوان الگو، هم ترازی دنباله ها و الگوهای هدف، ساخت مدل سه بعدی براساس تراز و اصلاح مدل ها، می باشد. مدل ساخته شده با استفاده از نرم افزار آنالین GalaxyRefine بهینه سازی شد.

اعتبار سنجی ساختار سوم پیش بینی 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 نرم افزارهای آنالین مانند ProSA و PROCHECK، کیفیت و قابلیت اطمینان مدل ساخته شده مورد ارزیابی قرار گرفت. یک نرم افزار آنالین حیاتی که برای بررسی مدل های سه بعدی پروتئین از نظر خطاهای احتمالی استفاده می شود، ProSA (<http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) است. این ابزار در تشخیص ساختارهای تجربی شناسایی شده، مدل های نظری و مهندسی پروتئین استفاده می شود. Z-score این سرور می تواند کیفیت مدل های 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 زنجیره های پروتئینی تعریف شده تجربی موجود در بانک داده پروتئین (PDB) را نشان می دهد. این ویژگی امتیاز یک مدل خاص را با امتیازات محاسبه شده از تمام ساختارهای تعریف شده که در PDB ذخیره شده اند، مقایسه می کند. علاوه بر این، کیفیت مدل های تولید شده با PROCHECK توسط طرح Ramachandran (موجود در <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php>) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار رامچاندرا هر جفت زاویه (ϕ , ψ) را در ساختار سه بعدی پروتئین مشخص شده به روش منطقی ساده نشان می دهد. نمودار رامچاندرا مدت هاست که در هر مرحله از کریستالوگرافی و مدل سازی پروتئین برای شناسایی زوایای پیچش زنجیره اصلی (ϕ , ψ) استفاده می شود.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

شبیه سازی دینامیک مولکولی برای ارزیابی پایداری ساختار پروتئین طراحی شده استفاده شد. برای این منظور از بسته ی نرم افزاری 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 لبه ها ۱ نانومتر فاصله داشت. پس

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 300 K و 100 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 300 K و $1/10$ بار و ظرف 100 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 $10\text{ \AA}$ انگستروم در نظر گرفته شد. از فاصله‌ی عدم تأثیر‌گذاری 1 nm 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 100 ns نانوثانیه برای بررسی پایداری ساختار پروتئین اجرا شد.

یافته‌ها

بازایی توالی، تعریف اپی‌توپ‌های خطی سلول B و طراحی سازه مولتی‌اپی‌توپ

توالی اسیدهای آمینه آنتی‌ژن‌های IgG immunoreactive antigen و receptor protein-tyrosine kinase در قالب FASTA از پایگاه داده Uniprot به دست 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 اپی‌تویی با استفاده از پیوندهای مناسب بین

مناطق انتخاب شده طراحی شد. مناطق انتخابی اپی‌توپ سلول B آنتی‌ژن‌های مدنظر، نشان داده شده در جدول شماره ۱، از طریق پیوند دهنده‌های EAAAK متصل شدند و ساختار چند اپی‌تویی طراحی شد.

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

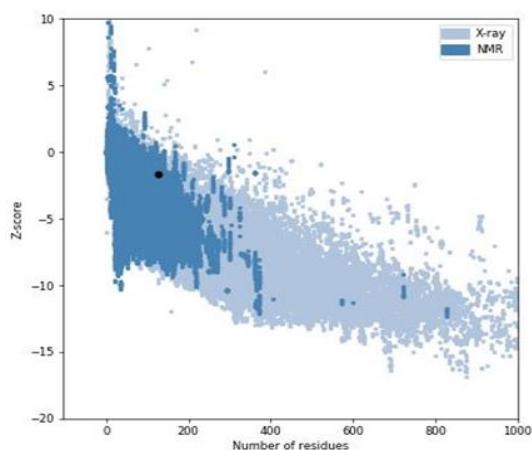
آنتی‌ژن	محل شروع اپی‌توپ	توالی آمیناسیدی اپی‌توپ
IgG immunoreactive	۱۳۶	PAGPEERDDDDGVDE
receptor protein-tyrosine kinase	۸۶۸	LGYKITLRNMDAEQTP
	۶۱۷	PNGIIAYEVS WKLP
	۶۵۰	RRTEKYLPIQDKLLTP
	۲۲۵	SCRYTMHRDICVERCP
	۲۱۰	CVGGCSKPGDPAYCNS

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

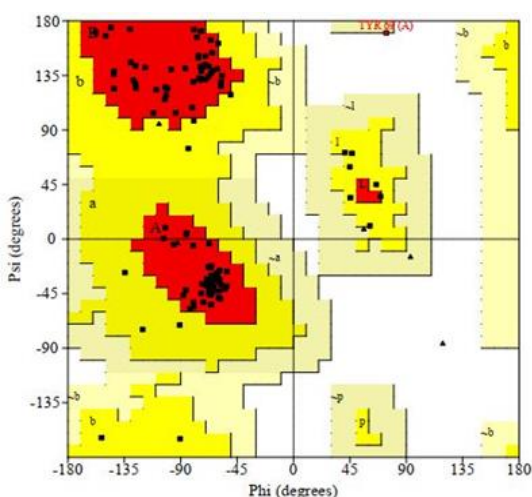
ویژگی‌های فیزیکی‌وشیمیایی ساختار طراحی شده توسط ProtParam محاسبه شد. وزن مولکولی (MW) و مقدار pI پروتئین طراحی شده حدود 14 kDa کیلو دالتون و $5/97$ بود. مقدار pI ماهیت اسیدی پروتئین را نشان داد. هم‌چنین این سازه از 127 اسید آمینه تشکیل شده است. شاخص ناپایداری (II) برابر با $39/85$ بود که نشان داد ساختار می‌تواند به‌عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته شود. شاخص آلفایتیک و مقدار GRAVY به صورت $60/94$ و $-0/788$ 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 با ساختارهای 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



تصویر شماره ۴: نمره Z برای مدل سه بعدی ساخته شده. همان گونه که مشاهده می شود نقطه سیاه که نمره مدل سه بعدی ساخته شده می باشد در ناحیه آبی پر رنگ یعنی ناحیه نمره های ساختارهای طبیعی قرار گرفته است.



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

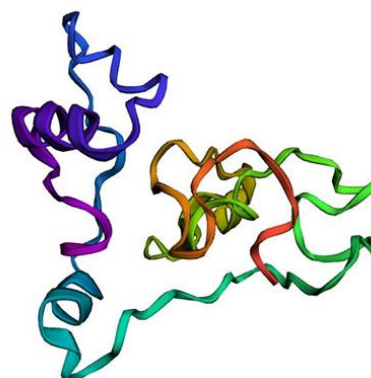
بحث

امروزه الایزا و روش های مرتبط با آن به دلیل هزینه کم، استفاده آسان، نتایج کم تر متغیر و سهولت اتوماسیون معمولاً از آزمایش های سرولوژیکی استفاده می شوند. با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، می توان تمام آنتی ژن های پروتئینی را به راحتی تولید و برای طراحی کیت الایزا به کار برد (۱۰).

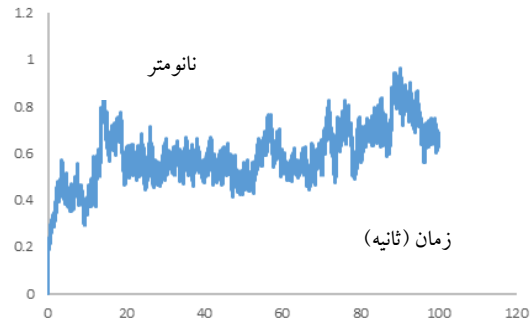
کیفیت ساختار سوم سازه طراحی شده است. نمره Z برای مدل ساخته شده ۱/۶۱- بود و در ناحیه تعیین ساختار شده پروتئین های طبیعی قرار داشت (تصویر شماره ۴). نمودار رامچاندرا نشان داد که ۸۶/۱، ۱۳/۹ و ۰/۰ درصد از بقایای اسید آمینه به ترتیب در منطقه مطلوب، منطقه مجاز و منطقه دورتر قرار دارند (تصویر شماره ۵).

نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی

برای بررسی پایداری ساختار پروتئین طراحی شده، شبیه سازی دینامیک مولکولی تا ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. پارامتر RMSD در آنالیز نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی پروتئین ها برای ارزیابی پایداری ساختار، انحراف و کانفورماسیون های پروتئین یا کمپلکس در طول دوره زمانی شبیه سازی، مورد استفاده قرار می گیرد. مقدار RMSD کم تر نشان دهنده پایداری بیش تر و نوسانات کم تر در طول شبیه سازی 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 شبیه سازی تا ۱۰۰ نانوثانیه حفظ شده است. از آنجایی که نوسانات در مدت زمان ۲۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه کم تر از ۰/۳ نانومتر بوده است ساختار پروتئین طراحی شده پایدار می باشد.



تصویر شماره ۳: تصویر از مدل سه بعدی ساخته شده برای پروتئین طراحی شده توسط نرم افزار آنالیز SAVES v6.0. سمت چپ آبی رنگ انتهای N و سمت راست تصویر سبز رنگ انتهای C می باشد.



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

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 می‌شود (۱۵). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سازه طراحی شده نیز از طریق ابزار بیوانفورماتیک پیش‌بینی شد. این سازه براساس امتیاز GRAVY -0.788 - آبدوست بود که برهمکنش آسان آن را با مولکول‌های آب نشان می‌دهد. مقدار 5.05 pI ویژگی اسیدی پروتئین طراحی شده را نشان داد. علاوه بر این، شاخص آلیفاتیک بالا 60.94 نشان داد که پروتئین طراحی شده می‌تواند پایدارتر در برابر حرارت باشد و همچنین مقدار شاخص ناپایداری 39.85 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 کایمیریک 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 استرونیلوییدازیس انسانی استفاده کرد.

سپاسگزاری

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

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 استرونیلوییدازیس، براساس اپی‌توپ‌های خطی سلول B آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن‌های receptor protein- IgG immunoreactive antigen 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 موتیف‌های 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

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.