

In Silico Design and Verification of LAMP-BDNF Chimeric Protein for Presentation of BDNF on the Surface of Exosomes for Drug Delivery Through Blood-Brain Barrier

Saeed Khalili¹,
Seyedeh Farzaneh Mahdavian²,
Niloufar Ahmadifard²,
Reza Valadan³,
Naghi Shahabi Majd³,
Hosein Ranjbaran⁴,
Mohammad Reza Mahdavi^{5,6},
Atena Sharif Razavi⁷,
Shabanali Khodashenas⁸

¹ Assistant Professor, Department of Biological Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

² MSc Student in Medical Biotechnology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Neurology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract

Background and purpose: The mature form of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) binds to BDNF/NT-3 growth factors receptor (Trk-B). This binding leads to activation of Ras–MAPK pathway which is integrated with cell growth and proliferation. The BDNF deficiency is correlated with various diseases and affects aging and miscellaneous. In the present study we aimed to design a chimeric LAMP-BDNF protein and assess its suitability to target neuronal cells employed in silico approaches.

Materials and methods: The specific binding between the BDNF and Trk-B would be used to guide the drug loaded lysosomes in to brain tissue. So, the structure of the chimeric BDNF/LAMP2 protein was predicted and its quality was confirmed using bioinformatics tools. Then, the interaction between the structures of BDNF/LAMP2 protein and Trk-B was analyzed by protein-protein docking. The orientation of the interaction between these proteins was compared to orientation of Trk-B interaction with its specific antibody using structural superimposition.

Results: Findings showed that the chimeric BDNF/LAMP2 protein could preserve the original structure of the BDNF molecule. Moreover, the chimeric BDNF/LAMP2 protein was found to be capable of interacting with Trk-B. The interaction orientation and binding affinity for BDNF/LAMP2 protein and Trk-B were similar to the orientation and binding affinity of interaction between Trk-B and its specific antibody.

Conclusion: The designed chimeric BDNF/LAMP2b protein would be capable of targeting the exosomes toward neural cells and provides better drug delivery to brain tissue.

Keywords: exosomes, BDNF, Trk-B, LAMP2, drug delivery

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (215): 49-61 (Persian).

Corresponding Author: Shabanali Khodashenas - Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran. (E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk)

طراحی پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF با روش in Silico و تأیید بیان این پروتئین در سطح اگزوزوم‌ها به منظور دارو رسانی از طریق سد خونی - مغزی

سعید خلیلی¹
سیده فرزانه مهدویان²
نیلوفر احمدی فرد²
رضا ولدان³
نقی شهابی مجد³
حسین رنجبران⁴
محمدرضا مهدوی^{5,6}
آتنا شریفی رضوی⁷
شعبانعلی خداشناس⁸

چکیده

سابقه و هدف: شکل بالغ فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز Brain Derived Neurotrophic Factor به گیرنده تروپومیزین کیناز B متصل می‌شود. این اتصال منجر به فعال شدن مسیر پیام‌رسانی Ras-MAPK می‌شود که در رشد و تکثیر سلول‌ها دخیل است. کمبود BDNF با بروز بیماری‌های مختلف و ظهور اثرات پیری مرتبط می‌باشد. این مطالعه با هدف طراحی پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF و ارزیابی آن برای هدف قرار دادن سلول‌های عصبی توسط روش‌های in silico، پذیرفت.

مواد و روش‌ها: اتصال بین BDNF و گیرنده Trk-B سبب هدایت لیروزوم‌های دارویی به داخل بافت مغز می‌شود. به همین منظور، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، ساختار پروتئین کایمیریک BDNF/LAMP2 پیش‌بینی و کیفیت آن تأیید شد. سپس تعامل بین ساختارهای پروتئین BDNF/LAMP2 و Trk-B با استفاده از روش‌های داکینگ پروتئین - پروتئین مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه فعل و انفعالات بین این دو پروتئین با فعل و انفعالات Trk-B با آنتی بادی خاص آن از روش برهم نهی ساختار استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که پروتئین کایمیریک BDNF/LAMP2 می‌تواند ساختار اصلی مولکول BDNF را حفظ کند و می‌تواند به Trk-B نیز اتصال یابد. فعل و انفعالات بین پروتئین‌های BDNF/LAMP2 و Trk-B مشابه فعل و انفعالات بین Trk-B و آنتی‌بادی اختصاصی آن بود.

استنتاج: با توجه به نتایج، پروتئین کایمیریک BDNF/LAMP2b که بر سطح اگزوزوم‌ها بیان می‌شود، قادر است سلول‌های عصبی را هدف قرار دهد و سبب انتقال بهتر دارو به بافت مغز شود.

واژه های کلیدی: اگزوزوم، BDNF، Trk-B، LAMP2، دارو رسانی

مقدمه

است که در نواحی هیپوکامپ، قشر و جلوی مغز وجود دارد و برای یادگیری، حافظه و تفکر ضروری است (1).

پروتئین Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رشد عصبی

مؤلف مسئول: شعبانعلی خداشناس **لیمونی - ساری:** دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات ایمنی ژنتیک E-mail: s.khodashenas@mazums.ac.ir

1. استادیار، گروه علوم زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم شهید رجایی، تهران، ایران
2. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، ساری، ایران
4. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
5. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
6. مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
7. استادیار، گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
8. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

© تاریخ دریافت: 1400/9/1 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/10/26 تاریخ تصویب: 1401/8/29

BDNF عضوی از خانواده نوروتروفین‌ها است که باعث بقای سلول‌های عصبی موجود شده و تکثیر و تمایز نورون‌های جدید و سیناپس‌ها را القا می‌کند. فرم بالغ BDNF به گیرنده‌ی فاکتورهای رشد BDNF/NT-3 متصل می‌شود، این گیرنده بر سطح پایانه‌های عصبی، آکسون‌ها و خارهای دندریتی سلول‌های گرانول و هرمی گلو تاما ترژیک در ناحیه هیپوکامپ و هم‌چنین بر سطح خارهای دندریتی نورون‌های ستون فقرات بیان می‌شود (2). اتصال BDNF-Trk-B باعث دایمریزاسیون Trk-B، اتوفسفوریلاسیون بخش c - ترمینال و فعال‌سازی مسیر Ras-MAPK می‌شود که در رشد و تکثیر دخیل می‌باشد (3). کمبود BDNF با اسکیزوفرنی، افسردگی، صرع، بیماری آلزایمر ارتباط دارد و سبب ظهور علائم پیری می‌شود (4-6). از این جهت، تحقیقات مختلفی برای استفاده از BDNF نو ترکیب با اهداف درمانی طراحی شده است (7،8). اما موانعی چون، سد خونی - مغزی (BBB)، پروتولیز در خون و کلیرانس کلیوی، برای دستیابی BDNF درمانی به سلول‌های مغزی وجود دارد (9). BBB مانع عبور 98 درصد از مولکول‌های کوچک و 100 درصد از مولکول‌های بزرگ مانند BDNF می‌شود. نفوذپذیری BBB در موارد آسیب مغزی مانند، صدمه به سر، سکته، بیماری‌های میکروبی و متابولیسمی افزایش می‌یابد (10،11).

دارو رسانی به مغز به‌طور کلی به دو دسته تهاجمی و غیر تهاجمی تقسیم می‌شود. در روش تهاجمی، BBB با فشار اسمزی و اختلال در اتصالات محکم بین سلولی تخریب می‌شود (11). اتصالات محکم که با فشار اسمزی باز می‌شوند می‌توانند علاوه بر داروهای درمانی، سایر داروها و سموم را نیز به مغز وارد کنند. به همین دلیل، روش‌های غیر تهاجمی توجه بیش‌تری را به خود جلب کرده‌اند (10). با افزایش خاصیت لیپوفیلی مولکول‌های دارویی کوچک، می‌توان انتقال آن‌ها را به مغز تسهیل کرد. اما، افزایش خاصیت لیپوفیلی برای همه داروها

کارآمد نیست (12). این افزایش می‌تواند منجر به از دست دادن خاصیت درمانی برخی داروها یا افزایش فعالیت پروتئین‌های خارج سلول مانند P-glycoprotein شود. علاوه بر این با افزایش پروفایل لیپیدی، متابولیسم و توزیع دارو، در بدن افزایش می‌یابد. این تغییرات می‌تواند به نوبه خود دوز دارو و در نتیجه عوارض دارو را افزایش دهد (13).

علاوه بر این، همه پیش‌سازهای موجود در مغز توانایی تجزیه ندارند. در چنین مواردی می‌توان از نانو ذرات برای انتقال دارو استفاده کرد (14). این نانو ذرات اجازه نمی‌دهند که مولکول‌های بزرگی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها یا ژن‌ها از BBB عبور کنند. ویژگی دیگر آن‌ها این است که پایداری کمی در محیط دارند، به سرعت متابولیزه می‌شوند و در مغز آزاد نمی‌شوند. در نتیجه، انواع مختلفی از نانو ذرات برای دارو رسانی به مغز بررسی شده‌اند (15-17). تحقیقات زیادی برای ارسال BDNF به مغز توسط نانو ذرات و هیدروژل‌ها انجام شده است (18). برخی از نانو ذرات سنتتیک، سمی و ایمنوژن هستند و برخی دیگر موانع زیادی برای هدف‌گیری سلول دارند (19). آگروزوم‌ها به عنوان نانو حامل‌های بیولوژیکی با توانایی انتقال ژن و دارو شناخته شده‌اند. آگروزوم‌ها، حاملین داروی درمانی، با اندازه 30 تا 100 نانومتر هستند و می‌توانند از BBB عبور کنند. برای انتقال مولکول‌های زیستی فعال به مغز استفاده می‌شوند هم‌چنین می‌توانند یک بافت خاص را هدف قرار دهند (20). مولکول Trk-B در سطح سلول بیان می‌شود و آگروزوم‌هایی که BDNF در سطح داخلی خود دارند ممکن است نتوانند به Trk-B متصل شوند. احتمالاً این نوع آگروزوم‌ها از غشا سلول عبور کرده و در لیزوزوم تخریب می‌شوند (21،22). با توجه به این شرایط، این مطالعه با هدف استفاده از ابزارهای *in silico* برای ارزیابی توانایی یک مولکول BDNF (بیان آن بر سطح آگروزوم و به صورت متصل به گلیکو پروتئین غشای لیزوزومی 2b (پروتئین LAMP2b) برای هدف قرار دادن Trk-B

BDNF و Trk-B از نرم افزار Editor Editor File File Protein Data Bank استفاده شده است.

طراحی، مدل سازی و بررسی خواص فیزیکو شیمیایی پروتئین هدف

مولکولی حاوی توالی LAMP2 و BDNF باید طراحی و مدل سازی شود تا بتواند اگزوزوم ها را به سمت گیرنده های Trk-B هدایت کند. به همین دلیل، چنین مولکولی با استفاده از روش های مختلف مدل سازی پروتئین طراحی و مدل سازی شد. از ابزار جست و جو Protein BLAST پایگاه داده ی NCBI به آدرس <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> جهت جستجوی الگوی مناسب برای پروتئین طراحی شده استفاده شد. جستجوی BLAST انجام شده محدود به پایگاه داده PDB بود. از سرور ITASSER به آدرس <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> سرور Muster به آدرس <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/MUSTER/> سرور LOMETS به آدرس <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS> و سرور Robetta به آدرس <http://robetta.bakerlab.org/> برای تکنیک مدل سازی پروتئین و طراحی پروتئین استفاده شد. بررسی خواص فیزیکو شیمیایی پروتئین طراحی شده توسط سرور PropParam انجام گرفت. ویژگی های مهم دیگر پروتئین طراحی شده توسط نرم افزارهای مختلف بررسی گردید. ویژگی سمیت توسط سرور ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred2>)، ویژگی آلرژی زایی توسط سرور Algpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>) و ویژگی ایمنی زایی توسط نرم افزار Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) مورد بررسی قرار گرفت (29-31).

انجام گرفت. روش های in silico قبلاً برای طراحی مولکول های مختلف بیولوژیکی و حل مسائل مختلفی که پرداختن به آنها بسیار هزینه بر یا غیر اخلاقی است، استفاده شده است (23-28). در این مطالعه نیز از یک روش in silico برای طراحی یک پروتئین کایمیریک جدید استفاده گردید که قادر به حل مسائل مرتبط با استفاده از BDNF است. نتایج نشان داد که از اگزوزوم های دارای BDNF طراحی شده در این مطالعه می توان برای هدف گیری Trk-B و دارو رسانی به ناحیه هیپوکامپ استفاده کرد.

مواد و روش ها

آنالیز توالی

توالی پروتئین های BDNF و Trk-B از پایگاه Uniprot به آدرس <http://www.uniprot.org/> به دست آمده و در پایگاه داده پروتئین NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> بررسی شده است. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی هر پروتئین توسط سرور PropParam به آدرس <https://web.expasy.org/protparam/> ارزیابی شد.

آنالیزهای ساختاری

در بانک داده ی پروتئینی (PDB) به آدرس <https://www.rcsb.org> جهت یافتن ساختار سه بعدی گلیکو پروتئین غشایی لیزوزومی 2 (LAMP2)، BDNF و Trk-B جستجو صورت گرفت. برای آنالیز دقیق تر ساختار پروتئین، از ساختارهای پروتئینی با وضوح بیش تر استفاده شد.

اصلاحات ساختاری

ساختارهای به دست آمده از PDB حاوی بخش های اضافی مانند مولکول های آب، لیگاندها و سایر دومین های پروتئینی است که برای انجام آنالیزهای بعدی باید حذف شوند. برای حذف این مولکول های غیر ضروری و به دست آوردن ساختار درست تر پروتئین های LAMP-2،

ارزیابی کیفی مدل طراحی شده و تصحیح آن

ساختاری با بهترین کیفیت جهت ارزیابی کیفی مدل طراحی شده بر روی ساختارهای سه بعدی مدل BDNF/LAMP2 انتخاب شد. سرور QMEAN به آدرس (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>)، سرور Prosa به آدرس (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) و سرور RamPage به آدرس (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) برای انجام ارزیابی کیفیت استفاده شد. بهترین مدل‌ها از نظر کیفیت توسط سرور 3 Drefine به آدرس (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine>) و سرور ModLoop به آدرس (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modloop>) تصحیح شد (32-36). کیفیت ساختار بهترین مدل‌ها پس از بهبود ساختاری مجدد توسط سرورهای QMEAN، Prosa و RamPage مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه ساختاری

ساختار پیش‌بینی شده BDNF/LAMP2 بر روی ساختار BDNF قرار گرفت تا نسبت شباهت ساختار مدل‌سازی شده به ساختار تجربی مورد ارزیابی قرار گیرد. برای انجام مقایسه ساختاری از نرم‌افزار Chimera v.1.10.2 استفاده شد.

داکینگ مولکولی

ساختار پروتئین BDNF/LAMP2 به عنوان مولکول هدف‌گیری کننده و ساختار Trk-B به دست آمده از (5MO9) به عنوان مولکول گیرنده برای انجام آنالیزهای داکینگ استفاده شد. پهلویی مولکولی برای این دو ساختار توسط (<http://zdock.umassmed.edu/>) ZDOCK و (<http://cluspro.bu.edu/login.php>) ClusPro که سرورهای داکینگ پروتئین-پروتئین هستند، پیش‌بینی شده است. اسید آمینه‌های درگیر در برهم‌کنش بین

پروتئین BDNF/LAMP2 و Trk-B با استفاده از نرم‌افزار LigPlot (v.2.2.5) مورد بررسی قرار گرفت و نمودار دو بعدی برهم‌کنش‌ها ترسیم گردید.

اعتبار سنجی نظری

برای بررسی دقت میل اتصال پیش‌بینی شده، ساختار پروتئین‌های Trk-B متصل به Fab آنتی‌بادی‌های آگونیست گیرنده تروپومیزین کیناز B با میل اتصال پیش‌بینی شده بین پروتئین‌های BDNF/LAMP2 و Trk-B به‌طور بصری مورد مقایسه قرار گرفت. میل اتصال مبتنی بر cotact با استفاده از نرم‌افزار PRODIGY در سرور (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy>) پیش‌بینی شد. میل اتصال مبتنی بر cotact بین هر دو کمپلکس ذکر شده با استفاده از نرم‌افزار PRODIGY در سرور (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy>) پیش‌بینی شد.

یافته‌ها

بازیابی توالی

توالی پروتئین‌های BDNF و Trk-B به ترتیب تحت شناسه P23560 Uniprot و Q16620 به دست آمد. مشخص شده است که طول مولکول BDNF 247 اسید آمینه است، در حالی که طول پروتئین Trk-B 822 آمینو اسید و بسیار بزرگ‌تر است. هر دو پروتئین در توالی خود دارای یک سیگنال پپتید هستند که وزن مولکولی آن‌ها 25766/33 Da برای BDNF و برای Trk-B 88319/50 Da تخمین زده می‌شود. همچنین نشان داده شد که فرم پیش ساز BDNF برای تبدیل به فرم فعال BDNF یک دومین پروپیتیدی به طول 109 اسید آمینه را از دست می‌دهد.

بازیابی ساختاری

جستجوی ساختار سه بعدی پروتئین LAMP-2 انسانی منجر به یافتن ساختاری با پوشش توالی کافی

نشد. دو ساختار سه بعدی برای توالی پروتئین BDNF وجود دارد که 119 اسید آمینه از انتهای C- ترمینال آن را پوشش می‌دهد.

ساختار ID PDB BND1 به دلیل استناد بیش‌تر نسبت به ساختار PDB ID 1B8M، برای آنالیز انتخاب شد. از بین ساختارهای مختلف پروتئین Trk-B، ساختار PDB ID 5MO9 دارای پوشش بالاتری برای قسمت خارج سلولی Trk-B (اسیدهای آمینه 278-426) بود که برای آنالیز بیش‌تر به کار گرفته شد.

اصلاحات ساختاری

مولکول ایزوپروپیل الکل (به عنوان یک لیگاند) و مولکول‌های آب از ساختار BDNF با شناسه PDB 1BND حذف شدند. ساختارهای زنجیره سنگین AB20 Fab، زنجیره سبک AB20 Fab و مولکول‌های آب از ساختار Trk-B (PDB ID 5MO9) حذف شدند. ساختارهای باقیمانده به عنوان فایل PDB جدید ذخیره شدند.

طراحی و مدل‌سازی پروتئین هدف و خواص فیزیکی شیمیایی

پروتئین مورد نظر با افزودن پروتئین BDNF به انتهای N- ترمینال پروتئین (BDNF/LAMP2) از طریق لینکر انعطاف‌پذیر GGGS طراحی شد. جستجوی یک الگوی مناسب جهت مدل‌سازی همولوژی برای BDNF/LAMP2 نتیجه مطلوبی را به همراه نداشت. بنابراین، از روش‌های ترکیبی برای مدل‌سازی این پروتئین استفاده شد. سرورهای Robetta و ITASSER قادر به مدل‌سازی ساختار BDNF/LAMP2 بودند. بررسی فیزیکی شیمیایی پروتئین طراحی شده نشان داد که این پروتئین وزن مولکولی معادل با حدود 57 kDa خواهد داشت. مقدار PI این پروتئین برابر با 7/01 خواهد بود. میزان (GRAVY) Grand average of hydropathicity برابر با -0/294- پیش‌بینی شده و به سبب داشتن (II) instability index

برابر با 25/81 این پروتئین در دسته‌ی پروتئین‌های پایدار قرار گرفته است. بررسی ویژگی سمیت این پروتئین نشان داد که این پروتئین در دسته‌ی پروتئین‌های غیر سمی قرار دارد. بررسی میزان آلرژی‌زایی احتمالی این پروتئین نیز نشان داد که این پروتئین می‌تواند در دسته‌ی غیر آلرژن‌ها قرار گیرد. بررسی میزان ایمنی‌زایی این پروتئین نیز نشان داد که می‌تواند این پروتئین را جز پروتئین‌های غیر آنتی‌ژنی محسوب کرد. کلیه ویژگی‌های به دست آمده نشان دادند که این پروتئین برای استفاده در بدن انسان ایمن بوده و می‌توان تا حدود زیادی در کاربردهای بالینی از پایداری و عدم ایجاد عوارض جانبی آن مطمئن بود.

ارزیابی کیفی و تصحیح مدل انتخاب شده

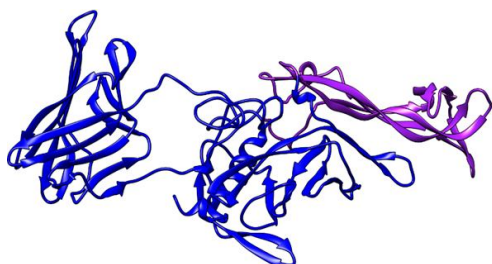
از بین ساختارهای طراحی شده توسط سرورهای مختلف، مدل طراحی شده توسط سرور Robetta به عنوان بهترین مدل انتخاب شده است. امتیاز کیفی این مدل از همه ساختارها بهتر بود (جدول شماره 1). سرور Robetta از روش مبتنی بر الگو برای مدل‌سازی نواحی دارای الگوی مناسب و از روش ab initio برای مدل‌سازی نواحی بدون الگو استفاده می‌کند. آنالیزهای تصحیح مدل، کیفیت مدل انتخاب شده را بهبود بخشیده است (جدول شماره 1). از مدل Robetta تصحیح شده برای آنالیز استفاده شد (تصویر شماره 1). بررسی نتایج کیفیت مدل‌های پیش‌بینی شده بعد از بهبود ساختاری نشان می‌دهد که انجام بهبود ساختاری قادر نبوده اسید آمینه‌هایی که در خارج از ناحیه مجاز در نمودار رامانچاندرا قرار داشته‌اند را به نواحی مجاز انتقال دهد.

برهم‌نهی ساختار

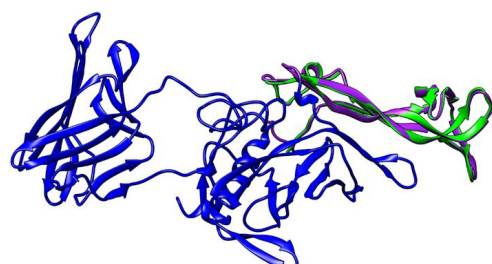
برهم‌نهی بین ساختار مدل‌سازی شده‌ی BDNF/LAMP2 و ساختار تجزیه شده تجربی BDNF نشان داد که مناطق برهم‌نهی با نمره RMSD کم (A° 0/67) بسیار شبیه هستند که نشان می‌دهد پیش‌بینی

جدول شماره 1: نتیجه ارزیابی کیفیت مدل، کیفیت مدل های سه بعدی قبل و بعد از تصحیح ارزیابی می شود.

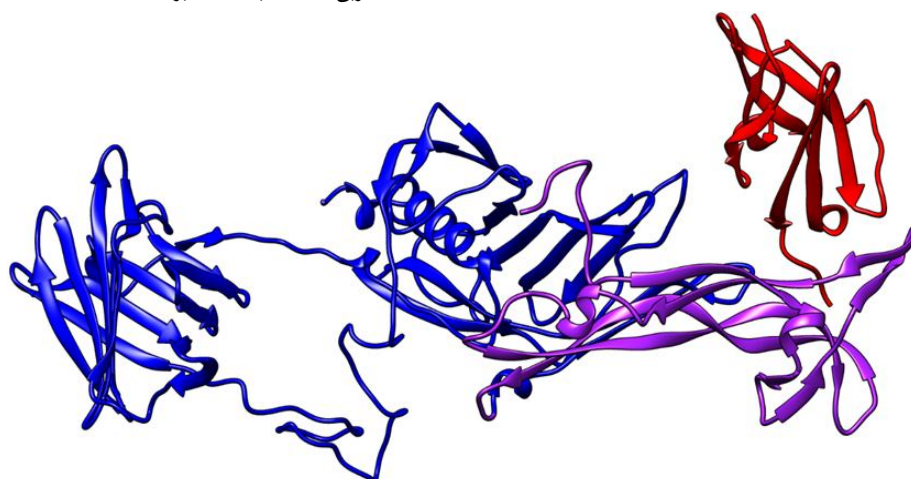
درصد امید	درصد امید	Prosa	Prosa	Qmean	Qmean	سرورها
آینه های	آینه های	بعد تصحیح	قبل تصحیح	score	score	
Outlier	Outlier			بعد تصحیح	قبل تصحیح	
0/8	0/8	-3/7	-3/6	0/58	0/56	Robetta
1/56	1/56	-3/1	-2/8	0/28	0/24	ITASSER
1/17	1/17	-3/4	-3/2	0/36	0/33	LOMETS
0/87	0/87	-3/2	-3/1	0/22	0/30	MUSTER



تصویر شماره 1: ساختار پروتئین کایمریک BDNF/LAMP2، ساختار BDNF (باقیمانده 8-125) به رنگ بنفش و ساختار LAMP2 (باقیمانده 133-514) به رنگ آبی است.



تصویر شماره 2: ساختارهای برهم نهی شده ی BDNF/LAMP2 و ساختار تجزیه شده تجربی BDNF (مدل سازی شده به رنگ بنفش است، LAMP2 به رنگ آبی و ساختار تجزیه شده تجربی BDNF به رنگ سبز است).



تصویر شماره 3: فعل و انفعالات بین پروتئین کایمریک BDNF/LAMP2 و ساختار تجزیه شده تجربی پروتئین Trk-B (مدل BDNF مدل سازی شده به رنگ بنفش، LAMP2 به رنگ آبی و ساختار تجزیه شده تجربی Trk-B به رنگ قرمز است).

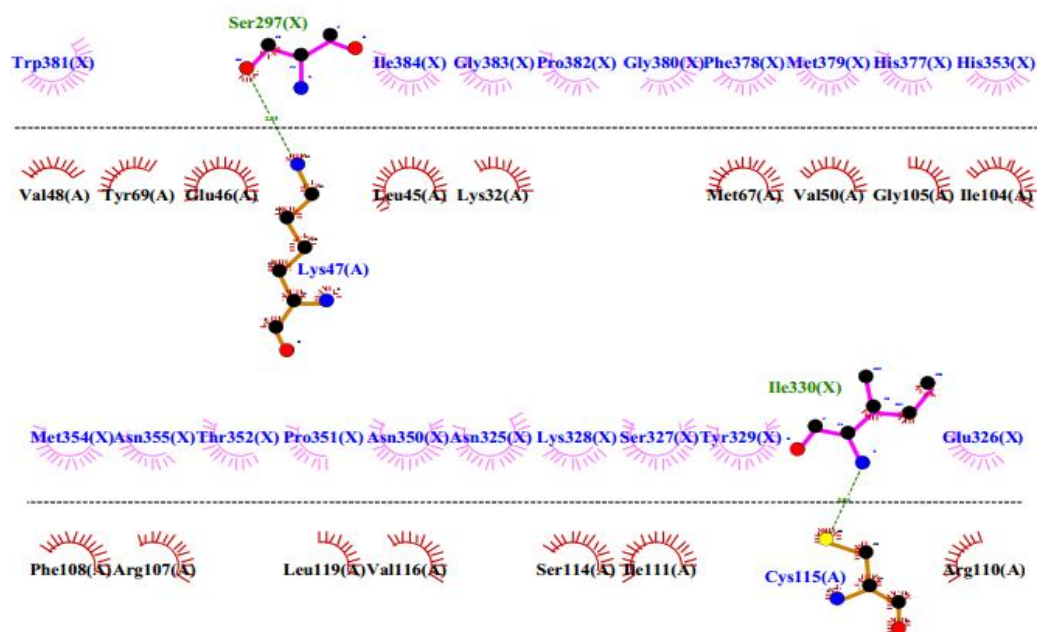
ساختار برای پروتئین BDNF/LAMP2 با کیفیت بالا انجام شده است (تصویر شماره 2).

داکینگ پروتئین - پروتئین

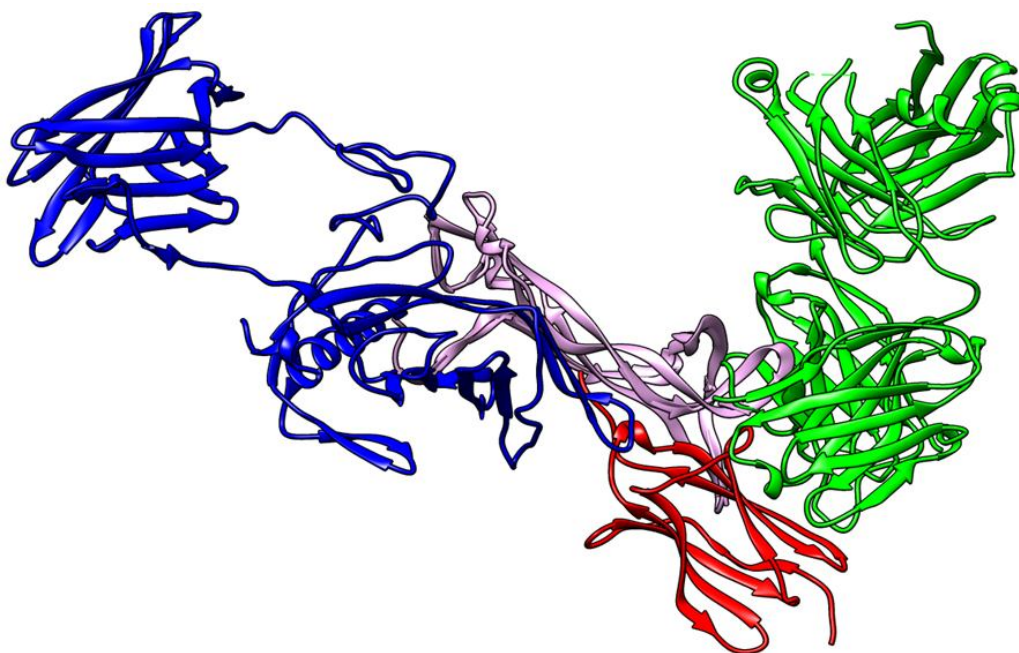
هر کدام از سرورهای ZDOCK و ClusPro چندین پهلویی احتمالی برای پروتئین های BDNF/LAMP2 و Trk-B را پیش بینی کرده اند (تصویر شماره 3). نتایج نشان می دهد که BDNF/LAMP2 و پروتئین Trk-B می توانند تعاملات محکمی با یکدیگر ایجاد کنند. نمودار دو بعدی برهم کنش بین پروتئین های BDNF/LAMP2 و Trk-B در تصویر شماره 4 نشان داده شده است.

اعتبار سنجی نظری

فعل و انفعالات بین پروتئین های BDNF/LAMP2 و Trk-B مشابه فعل و انفعالات Fab آنتی بادی های آگونیست گیرنده تروپومیزین کیناز B با پروتئین Trk-B بود (تصویر شماره 5). این بدان معنی است که قدرت اتصال BDNF/LAMP2 و Trk-B مشابه قدرت اتصال Trk-B و آنتی بادی اختصاصی آن است (جدول شماره 2).



تصویر شماره 4: اسید آمینه‌های درگیر در برهم کنش بین پروتئین‌های BDNF/LAMP2 و Trk-B به صورت نمودار دو بعدی نشان داده شده است، اسید آمینه‌های ردیف بالا با نام زنجیره (X) مربوط به Trk-B و ردیف پایین با نام زنجیره (A) مربوط به BDNF/LAMP2 می‌باشد.



تصویر شماره 5: ساختارهای برهم نهی شده پروتئین Trk-B (قرمز) با پروتئین کایمریک BDNF/LAMP2 (BDNF مدل‌سازی شده به رنگ بنفش و LAMP2 به رنگ آبی است) و Fab آنتی‌بادی‌های آگونیست گیرنده تروپومیوزین کیناز B (سبز). هر دو پروتئین کایمریک BDNF/LAMP2 و Fab آنتی‌بادی‌های آگونیست گیرنده تروپومیوزین کیناز B، در یک موقعیت مشابه با Trk-B ارتباط برقرار می‌کنند.

جدول شماره 2: میل اتصال بین پروتئین‌های 5MO9 و کمپلکس BDNF/LAMP2 طراحی شده و Trk-B.

25°C در Kd (M)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ساختارها
1/7 E-08	- 10/6	5MO9
1/1 E-08	- 10/9	Trk-B و BDNF/LAMP2 طراحی شده

بحث

سد خونی - مغزی، مانع از نفوذ غیر تهاجمی بسیاری از داروهای بیولوژیک مانند آنتی‌بادی‌ها، هورمون‌ها و آنزیم‌ها به مغز می‌شود که می‌توانند برای درمان بیماری‌های مغزی از جمله آلزایمر (AD)، مالتیپل اسکلروزیس (MS) استفاده شوند (37).

روش‌های مختلفی که برای غلبه بر BBB بررسی شد، می‌توان از افزایش نفوذپذیری BBB توسط روش‌های فیزیکی، پیوند موادی که دارو را به آهستگی در مغز آزاد می‌کنند و استفاده از نانو ذرات که قادر به عبور از BBB هستند، نام برد. افزایش نفوذپذیری به صورت فیزیکی و انجام پیوند، روش‌های تهاجمی است که می‌تواند منجر به آسیب بافتی شود (38،39). از نانو ذرات اگزوزوم به عنوان حاملین دارو برای دارورسانی به مغز استفاده شده است (40،41). اندازه این وزیکول خارج سلولی کم‌تر از 200 نانومتر است و حاوی ماده‌ی زیست فعالی است که برای ارتباط سلول با سلول به کار می‌رود. این نانو ذره می‌تواند از BBB عبور کرده و به سلول‌های مغزی برسد. اولین دارورسانی به وسیله اگزوزوم‌ها توسط Wood و همکارش انجام شده است (42). آن‌ها ARG binder را بر سطح اگزوزوم‌ها برای هدف‌گیری گیرنده‌های نیکوتینیک اسید بر سطح نورون بیان کردند. هدف‌گیری سلول‌های عصبی مغز به گیرنده خاصی نیاز دارد که در سطح سلول بیان شود. Trk-B یک پروتئین ترانس ممبران است که در سلول‌های عصبی ناحیه هیپوکامپ بیان می‌شود و با اتصال BDNF فعال می‌شود. از آن‌جا که Trk-B به ندرت در بافت‌های دیگر بیان می‌شود، یک فاکتور هدف‌گیری مناسب است. ناحیه اتصال BDNF مشابه قطعه Fab است و عمدتاً به صورت

صفحه بتا با طول 130 اسید آمینه فولد می‌شود. این پروتئین برای سلول‌های ایمنی مانند سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) یک ترکیب طبیعی است و ایمنوژن نیست. فرض ما این هست که BDNF بیان می‌شود، Trk-B را روی سلول‌های عصبی هدف می‌گیرد و در نتیجه تکثیر سلولی را القا می‌کند (22). در مطالعه قبلی محققین مطالعه حاضر، پروتئین darpins در سطح اگزوزوم بیان گردید تا سلول‌های سرطانی her2 مثبت را هدف قرار دهد. توالی darpins با LAMP2b الحاق شده و در سطح اگزوزوم بیان می‌شود. مطالعات *in silico* نشان داده است که می‌توان از آنتی ژن طراحی شده برای هدف گرفتن her2 استفاده کرد. بعداً، نتایج حاصل از روش *in silico* با استفاده از روش‌های تجربی تأیید شد (43-45). هدف از این مطالعه، طراحی پروتئین کایمریک LAMP-BDNF و ارزیابی آن برای هدف‌گیری سلول‌های عصبی به روش *in silico* است. در این مطالعه دومین اتصال BDNF به Trk-B انتخاب کرده و توسط یک لینکر آن را به ناحیه غشا گذر LAMP2b متصل گردید، سپس این ساختار مدل‌سازی شد و از نظر میل اتصال مورد آنالیز قرار گرفت. استفاده از لینکر می‌تواند منجر به افزایش پایداری و فعالیت زیستی بهتر پروتئین طراحی شده گردد. استفاده از لینکر انعطاف‌پذیر نیز امکان عملکرد بخش‌های مختلف پروتئین طراحی شده را به صورت بخش‌های مجزا فراهم خواهد آورد (46). BDNF در مطالعه‌ای که توسط صباغیان و همکاران انجام شد گلیکو پروتئین B و ویروسی و فسفو پروتئین 65 و 150 به عنوان نواحی حفاظت شده آنتی ژن‌های سایتومگالو ویروس با بالاترین خاصیت ایمنی‌زایی انتخاب شدند. اپی‌توپ هدف مناسب با ابزارهای بیوانفورماتیک و روش *in silico* پیدا شد. در این مطالعه یک ساختار ژنی نو ترکیب جدید حاوی اپی‌توپ‌های چند آنتی ژنی طراحی شد که یک واکسن مناسب و ایمن علیه HCMV خواهد بود. نتایج مطالعه نشان داد که واکسن طراحی شده محرک پاسخ‌های

ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد (47). Cruz-Rodriguez و همکاران یک واکسن پیشگیرانه با روش *Silico in* طراحی کردند که هدف آن محافظت در برابر سرطان سینه و تخمدان درگیر در متاستاز سرطان ریه می‌باشد. در این مطالعه، با ترکیب cDNA - پپتید یک ضد تومور پایدارتر در برابر سرطان سینه و تخمدان ارائه کردند. این cDNA - پپتید شامل همجوشی ژن Her2 با پپتیدهای Her2 و پروتئین‌های PARP-1 انسانی بود. اگزوزوم‌ها به عنوان بیومارکرهای سرطان زایی ریه بعد و قبل از واکسیناسیون پیشنهاد شدند. با توجه به نتایج *in silico*، cDNA - پپتید میل ترکیبی بالایی با اگزوزوم‌ها در مرحله متاستاز نشان داد و فعالیت ضد توموری آن مشخص شد (48). در مطالعه‌ی Sharma و همکاران با روش *in-silico* یک واکسن چند اپی‌توبی از پروتئین‌های اگزوزومی ایمونوژنیک برای برانگیختن پاسخ ایمنی سلولی و هومورال علیه باکتری سل طراحی کردند. برای این کار از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک، غیر حساسیت‌زا پروتئین اگزوزومی سلولی‌های B، HTL و CTL انتخاب شد. برای ایمنی زایی بهتر واکسن، از توالی پپتیدی آگونیست TLR4 به عنوان ادجوانت واکسن استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از روش *in silico* و شبیه سازی ایمنی اتصال لیگاند - گیرنده مناسب بود و واکسن می‌توانست پاسخ ایمنی خوبی ایجاد کند (49). موثرترین کاندید برای درمان انواع اختلالات عصبی است و مطالعات مختلفی برای ارسال این فاکتور رشد به سیستم عصبی مرکزی، انجام شده است (41). به دلیل وجود سد خونی - مغزی، BDNF و چندین داروی مورد تایید FDA نمی‌توانند جهت درمان بسیاری از اختلالات عصبی و آسیب‌های مغزی مورد استفاده قرار گیرند. چندین طرح تحقیقاتی برای ایجاد روشی موثر برای عبور ریز داروها به ویژه BDNF از طریق BBB ارزیابی شده است. برای دور زدن این مسائل، به یک حامل نیاز است. اگزوزوم‌ها ناقلینی با این خصوصیات مورد نظر

هستند. پروتئین‌های مختلفی را می‌توان در سطح آن‌ها بیان کرد و ترکیبات دارویی مختلفی را درون آن‌ها بارگذاری کرد. با توجه به این خصوصیات، در مطالعه حاضر، پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF طراحی گردید تا در سطح اگزوزوم‌ها بیان شود.

براساس نتایج مطالعه حاضر، پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF می‌تواند خواص ساختاری BDNF را حفظ کند. ساختار دست نخورده BDNF می‌تواند خواص عملکردی آن از جمله میل اتصالی آن به Trk-B را حفظ کند. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین کایمیریک طراحی شده در سطح *in silico* میل ترکیبی بالایی به Trk-B دارد. بنابراین انتظار می‌رود که پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF که بر سطح اگزوزوم بیان خواهد شد بتواند اگزوزوم‌ها را به سمت سلول‌های عصبی و گیرنده Trk-B هدایت کند. این ویژگی منجر به انتقال موثر و هدفمند داروهای قرار گرفته درون اگزوزوم‌ها برای اهداف مختلف درمانی خواهد شد.

با توجه به یافته‌های امیدوارکننده مطالعه انجام شده می‌توان مطالعات تجربی بیش‌تری را برای ارزیابی بیش‌تر نتایج به دست آمده انجام داد. پیشنهاد می‌شود از طریق مهندسی ژنتیک پروتئین کایمیریک تولید شود و جهت کارایی آن مطالعاتی در سطح *in vitro* و *in vivo* نیز انجام شود.

در پایان باید اشاره کرد که در این مطالعه یک پروتئین کایمیریک LAMP-BDNF طراحی شد که قادر به تعامل کارآمد با پروتئین Trk-B است. از آن‌جا که این پروتئین کایمیریک بر سطح اگزوزوم بیان می‌شود، این نوع از اگزوزوم‌ها می‌توانند از BBB عبور کنند و اتصال قوی بین پروتئین کایمیریک و پروتئین Trk-B برقرار شود در نهایت داروهای بارگیری شده در اگزوزوم‌ها به سلول‌های عصبی هدف می‌رسند.

References

1. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 2010;3:1.
2. Jungbluth S, Bailey K, Barde YA. Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur J Biochem* 1994; 221(2): 677-685.
3. Chiamello S, Dalmasso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, et al. BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 2007; 26(7): 1780-1790.
4. Reinhart V, Bove SE, Volfson D, Lewis DA, Kleiman RJ, Lanz TA. Evaluation of TrkB and BDNF transcripts in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum from subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neurobiol Dis* 2015; 77: 220-227.
5. runoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008; 11(8): 1169-1180.
6. Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, et al. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res* 1999; 818(2): 579-582.
7. Ma X-c, Liu P, Zhang X-l, Jiang W-h, Jia M, Wang C-x, et al. Intranasal delivery of recombinant AAV containing BDNF fused with HA2TAT: a potential promising therapy strategy for major depressive disorder. *Sci Rep* 2016; 6: 22404.
8. Kim SJ, Choi SW, Hur KJ, Park SH, Sung YC, Ha Y, et al. Synergistic effect of mesenchymal stem cells infected with recombinant adenovirus expressing human BDNF on erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Korean J Urol* 2012; 53(10): 726-732.
9. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005; 2(1): 3-14.
10. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 1998; 37(12): 1553-1561.
11. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 2010; 37(1): 48-57.
12. Watts PJ, Smith A. Re-formulating drugs and vaccines for intranasal delivery: maximum benefits for minimum risks? *Drug discov Today* 2011; 16(1-2): 4-7.
13. Hartkoorn RC, Chandler B, Owen A, Ward SA, Squire SB, Back DJ, et al. Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis* 2007; 87(3): 248-255.
14. Dong X. Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* 2018; 8(6): 1481-1491.
15. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release* 2016; 235: 34-47.

16. Xia H, Gao X, Gu G, Liu Z, Hu Q, Tu Y, et al. Penetratin-functionalized PEG-PLA nanoparticles for brain drug delivery. *IntJ Pharm* 2012; 436(1-2): 840-850.
17. Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(6): 454-477.
18. Pakulska MM, Ballios BG, Shoichet MS. Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed Mater* 2012; 7(2): 024101.
19. Studer AM, Limbach LK, Van Duc L, Krumeich F, Athanassiou EK, Gerber LC, et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett* 2010; 197(3): 169-174.
20. Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *AnnuRev Biochem* 2019; 88: 487-514.
21. Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66(2): 395-403.
22. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003; 91(4): 267-270.
23. Khalili S, Zakeri A, Hashemi ZS, Masoumikarimi M, Manesh MRR, Shariatifar N, et al. Structural analyses of the interactions between the thyme active ingredients and human serum albumin. *Turkish Journal of Biochemistry* 2017; 42(4): 459-467.
24. Khalili S, Rasaei MJ, Mousavi SL, Amani J, Jahangiri A, Borna H. In silico prediction and in vitro verification of a novel multi-epitope antigen for HBV detection. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2017; 32(4): 230-240.
25. Mard-Soltani M, Rasaei MJ, Khalili S, Sheikhi A, Hedayati M, Ghaderi-Zefrehi H, et al. The Effect of Differentially Designed Fusion Proteins to Elicit Efficient Anti-human Thyroid Stimulating Hormone Immune Responses. *Iran J Allergy, Asthma and Immunol* 2018; 17(2): 158-170.
26. Rahbar MR, Zarei M, Jahangiri A, Khalili S, Nezafat N, Negahdaripour M, et al. Trimeric autotransporter adhesins in *Acinetobacter baumannii*, coincidental evolution at work. *Infect Genet Evol* 2019; 71: 116-127.
27. Bahrami AA, Payandeh Z, Khalili S, Zakeri A, Bandehpour M. Immunoinformatics: in Silico approaches and computational design of a multi-epitope, immunogenic protein. *IntRev Immunol* 2019; 38(6): 307-322.
28. Payandeh Z, Rahbar MR, Jahangiri A, Hashemi ZS, Zakeri A, Jafarizadeh M, et al. Design of an engineered ACE2 as a novel therapeutics against COVID-19. *J Theor Biol* 2020; 505: 110425.
29. Sharma N, Naorem LD, Jain S, Raghava GP. ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins. *Brief Bioinform* 2022; 23(5): bbac174.
30. Saha S, Raghava GPS. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(suppl_2): W202-W209.
31. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(1): 1-7.
32. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 2011; 27(3): 343-350.

33. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* 2007; 35(suppl_2): W407-W410.
34. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Applied Crystallography* 1993; 26(2): 283-291.
35. Bhattacharya D, Nowotny J, Cao R, Cheng J. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(W1): W406-W409.
36. Fiser A, Sali A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics* 2003; 19(18): 2500-2501.
37. Scherrmann J-M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascular Pharmacol* 2002; 38(6): 349-354.
38. Gao P, Nie X, Zou M, Shi Y, Cheng G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *J Antibiot* 2011; 64(9): 625-634.
39. Silva GA. Nanotechnology approaches for drug and small molecule delivery across the blood brain barrier. *Surg Neurol* 2007; 67(2): 113-116.
40. van den Boorn JG, Schlee M, Coch C, Hartmann G. SiRNA delivery with exosome nanoparticles. *Nat Biotechnol* 2011; 29(4): 325-326.
41. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* 2015; 207: 18-30.
42. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 2011; 29(4): 341-345.
43. Limoni SK, Moghadam MF, Moazzeni SM, Gomari H, Salimi F. Engineered exosomes for targeted transfer of siRNA to HER2 positive breast cancer cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2019; 187(1): 352-364.
44. Khodashenas S, Moghadam MF, Moazzeni SM. In Silico Design and Verification of a Chimer Protein to Target Exosomes Towards HER2 Positive Cancer Cells. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 2016; 13(2): 911-916.
45. Gomari H, Moghadam MF, Soleimani M, Ghavami M, Khodashenas S. Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *Int J Nanomedicine* 2019; 14: 5679-5690.
46. Chen X, Zaro JL, Shen W-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(10): 1357-1369.
47. Sabbaghian E, Roodbari F, Rafiei A, Amani J. In silico design of a multimeric polytope as a highly immunogenic DNA vaccine against human cytomegalovirus. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 2014; 1(4): 143-53.
48. Luis C-R, David LB. A Novel Vaccine RNA-peptide against HIV-1: Exosomes as Carrier in Viral Progression. *Int J Infectious Dis Res* 2021; 292: 1-8.
49. Sharma R, Rajput VS, Jamal S, Grover A, Grover S. An immunoinformatics approach to design a multi-epitope vaccine against Mycobacterium tuberculosis exploiting secreted exosome proteins. *Sci Rep* 2021; 11(1): 13836.