طراحی پروتئین نوترکیب حاوی اپی توپ های محافظت شده آنتی‌ژن هماگلوتینین ویروس آنفولانزای سویه های H1N1 و H5N1 با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک

فرناز مقدم[1]، مرتضی تقی زاده طرنابی[2]، رضا منصوری*[1]، مجید تبیانیان*[2]، مهران دباغیان[2]

[1]گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
[2]گروه تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۷/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/٤/۱۵

چکیده

مقدمه: درسال های اخیر و با توجه به پیشرفت های انجام شده درحوزه بیوانفورماتیک، طراحی واکسن آنفولانزا دستخوش پیشرفت های قابل ملاحظه ای شده است. هدف از این مطالعه طراحی یک پروتئین نوترکیب چندظرفیتی برمبنای اپی توپ بسیار محافظت شده پروتئین هماگلوتینین سویه‌های H1N1 و H5N1 است که در طی زمان دچار تغییر و موتاسیون نمی شوند.

روش کار: برای این منظور و با توجه به مطالعات میدانی قبلی توالی سویه‌های مورد نظر بررسی شد و اپی‌توپ‌هایی از این سویه‌ها انتخاب شدند.پس از بررسی خصوصیات ایمنی زائی و شیمیائی اپی توپ های انتخاب شده توسط سرور های مناسب، ساختاراولیه پروتئین نوترکیب تعیین شد و متعاقب ترجمه معکوس توالی فوق ، بهینه‌سازی کدون انجام شد و در نهایت توالی بهینه شده در درون وکتور PET32a+ و دربین دو ناحیه آنزیمی BamHI/XhoI قرارداده شد.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که پروتئین نوترکیب حاصله دراین مطالعه دارای وزن ملکولی 22451.72 g/mol با 214 اسید آمینه می باشد. pH ایزوالکتریک پروتئین فوق ۷/۲۵ و میزان حلالیت آن درسیستم پروکاریوتی ۱۰۰ درصد است. ضریب خاموشی ساختار فوق نیز به میزان $M^{-1}cm^{-1}$ ٦۰۱۷۰ تعیین شد. در نهایت و پس ازبهینه سازی کدون، شاخص انطباق کدون (CAI)پروتئین نیز به میزان ۰/۹۵محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: در نهایت وباتوجه به داده‌های فوق پیش‌بینی می‌شود که ساختار چند اپی توپی طراحی شده دراین مطالعه که دارای خصوصیات ایمونولوژیکی منحصر بفرد و قابل قبولی است را می‌توان با موفقیت و به میزان قابل قبولی درسیستم پروکاریوتی بیان نمود و جهت مطالعات ایمنی زائی برعلیه ویروس آنفولانزای A مورداستفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: ویروس آنفولانزا، ایمونوانفورماتیک، هماگلوتینین، مولتی اپی‌توپ

نویسنده مسئول:
گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
گروه تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۰۹۱۲۵۴۳۳۶۸۴
۰۹۱۲۵۱۳۴۳۵۶
E-mail: majidtebianian@gmail.com
Rmansouri@ssu.ac.ir

مقدمه

آنفولانزا یکی از مهمترین بیماری‌های مسری تنفسی و عفونی است و علیرغم انجام واکسیناسیون هنوز یکی از علل عمده مرگ و میر می‌باشد و سلامت عمومی را در سراسر جهان تهدید می‌کند.[۱-۴] ویروس آنفولانزا متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده بوده و به چهار ساب تایپ تقسیم می‌شود که شامل A، B ، C و D است.[۲و۳] نوع A این ویروس باعث مرگ و میر بسیاری می‌شود به همین علت تحقیقات زیادی بر روی آن انجام شده است.[۲]

ویروس آنفولانزای مرغی H5N1 و پاندمیک H1N1 2009 موجب آلودگی انسان و اپیدمی است، شیوع ویروس بسیار بیماریزای H5N1 در آسیا منجر به ایجاد یک موقعیت اضطراری برای بهبود ابزارهای تشخیصی و کمک به مهار و کاهش خطر ابتلا به این بیماری همه گیر شده است.[۱و۵] واکسیناسیون مقرون به صرفه ترین اقدام برای جلوگیری از آنفولانزا می‌باشد و تنها وسیله ای است که می‌توان با آن از شیوع آنفولانزا در سطح وسیع جلوگیری نمود.[۶] در واکسن‌های رایج از ویروس‌های کشته شده و یا زنده ضعیف شده استفاده می‌شود که تکنولوژی تولید هر دو بر پایه کشت ویروس زنده است که می‌تواند باعث کاهش میزان توسعه واکسن شود.[۴] واکسن‌های فصلی رایج تنها در برابر سویه‌های درحال چرخش موثر هستند و در برابر آنفولانزای پاندمیک محافظت کمی دارند و یا محافظتی ایجاد نمی کنند.[۶] متاسفانه به دلیل میزان بالای جهش، ویروس می‌تواند از شناسایی شدن توسط لنفوسیت T و آنتی بادی‌ها فرار کند، واکسن‌های فعلی نتوانسته اند این ویروس را شکست دهند.[۷]

پروتئین های هماگلوتینین (Hemagglutinin یا HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase یا NA) ، آنتی ژن گلیکوپروتئینی اصلی هستند که در خارج از ویروس قرار دارند و به ترتیب باعث توانایی ویروس برای فرار و نفوذ به سلول میزبان می‌شوند.[۳و۸] پروتئین HA می‌تواند به دو دومن عملکردی مختلف تقسیم شود، بخش سر و ساقه که به ترتیب شامل محل رسپتور اتصالی (RBS) و قسمت اتصالی است.[۸] در ناحیه پپتید اتصالی (Fusion Peptide) در ساقه هماگلوتینین و همچنین در نواحی RBS ویروس آنفولانزا نواحی بسیار محافظت شده ای وجود دارند که به عنوان اهداف مهم در ساخت واکسن مد نظر قرار می‌گیرند.[۱و۸] استفاده از پپتیدهای سنتتیک در واکسن‌ها مزایایی مانند سهولت نسبی در ساخت ، ثبات شیمیایی و اجتناب از هر گونه خطر احتمالی عفونت دارد.[۹]

در مطالعاتی که بر روی مدل‌های حیوانی انجام شده است ثابت شده که لنفوسیت های T سایتوتوکسیک (CTL) با شناسائی پروتئین‌هایی که از طریق مولکول های MHCI پردازش و عرضه می‌شوند، می توانند پاسخ ایمنی محافظتی را برعلیه ویروس آنفولانزا القا نمایند.[۱۰] اغلب اپی‌توپ‌هایی که توسط CTL شناسائی می شوند در پروتئین‌های داخلی ویروس قرار دارند اما اپی‌توپ‌های محدودی نیز در ساختار HA وجوددارند که سلول های CTL می‌توانند آن‌ها را شناسایی کنند.[۱۱] با توجه به این امر، پاسخ لنفوسیت های CTL به واکسن‌های اپی‌توپی کاملا به ساختارمولکول های سازگاری نسجی (HLA) وابسته است. لذا پلی مورفیسم این مولکول‌ها در جمعیت هدف یکی از مشکلات طراحی واکسن کارآمد است. بنابراین باید درطراحی این واکسن‌ها اپی‌توپ‌هایی از لنفوسیت T انتخاب شوند که قدرت ایجاد پاسخ در غالب جمعیت را داشته باشند.[۹]

علاوه بر لنفوسیت های CTL، اهمیت سلول های TCD4+ نیز در طی پاسخ ایمنی در برابر ویروس آنفولانزا مورد توجه قرار گرفته است. این دسته از لنفوسیت‌ها به عنوان سلول های یاریگرشناخته می شوند و با شناسائی پتتیدهای ارائه شده توسط مولکول های MHCII، باعث راه اندازی و تقویت پاسخ های وابسته لنفوسیت های CD8+ (از جمله CTL) و لنفوسیت های B در برابر عفونت ویروس آنفولانزا می شوند.[۱۲] بهترین استراتژی برعلیه آنفولانزا استفاده از یک واکسن ترکیبی است که اپی‌توپ‌های آن توسط هر دو دسته از مولکول های MHCI و MHCII عرضه شوند و بر علیه مناطق بسیار محافظت شده ی HA و NA باشد. تا به امروز نیز تمرکز پژوهشگرها توسعه واکسن‌های جهانی با اثر بخشی متقاطع در برابر انواع ویروس آنفولانزا بوده است، این تمرکز بر روی نواحی بسیار محافظت شده می‌باشد که می‌تواند باعث پاسخ‌های گسترده سلولی یا هومورال شود.[۱و۳و۶]

با توجه به موارد ذکر شده و مطالعات قبلی، هدف از این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیک پروتئین هماگلوتینین سویه‌های

H1N1 و H5N1 و طراحی یک پروتئین نوترکیب چند اپیتوپی بر اساس مناطق بسیار محافظت شده این پروتئین که در طی زمان دچار تغییر و موتاسیون نمی شوند می باشد تا به عنوان یک کاندید بالقوه در تهیه واکسن های مؤثر بر علیه آنفولانزا مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

با توجه به مطالعات میدانی قبلی توالی سویه‌های مورد نظر از بانک ژن درنظرگرفته شد و اپی‌توپ‌هایی از این سویه‌ها انتخاب شدند. شماره دسترسی (Accession number) توالی‌های انتخاب شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

پیشگویی ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌ها

به منظور پیش بینی پاسخ ایمنی سلولی با استفاده از دو سرور epitopeIEDB و CTLpred امتیاز اتصال اپی‌توپ‌های انتخاب شده به مولکول‌های MHCI و MHCII بررسی شد.

برای تعیین ایمنی زایی توالی‌ها و واکنش پذیری لنفوسیت های T از IMMUNE EPITOPE DATABASE (IEDB.org) استفاده شد که یک پایگاه مبتنی بر نتایج تجربی و ابزارهای مبتنی بر وب برای مطالعه اپی‌توپ‌ها است. با استفاده از این نرم افزار سکانس‌های پپتیدی و احتمال اتصال آنها به مولکول‌های MHC و پاسخ‌های ناشی از لنفوسیت T مورد ارزیابی قرار گرفت.[۱۳]

پیش بینی مشخصات شیمیایی اپی‌توپ‌ها

میزان حلالیت اپی‌توپ‌های انتخاب شده به وسیله سرورهای http://www.biotech.ou.edu و https://sable.cchmc.org ، میزان pH ایزوالکتریک اپی‌توپ‌ها از طریق سرور Peptide property calculator (https://pepcalc.com) و میزان آلرژی زایی آنها با استفاده از سرور AlgPred سنجیده شدند. در نتیجه آن دسته از اپی‌توپ‌های دارای حلالیت مناسب که فاقد خاصیت آلرژیک و دارای pH ایزوالکتریک بودند برای ادامه کار انتخاب شدند.

با توجه به این که هدف نهایی دراین مطالعه، بیان پروتئین نوترکیب طراحی شده در سیستم پروکاریوتیک می‌باشد ، در نتیجه اپی‌توپ‌هایی که محل‌های N-Glecosilated دارند می بایست حذف شوند. بنابراین اپی‌توپ‌های انتخابی در پایگاه NetNGlyc 1.0 مورد بررسی قرار گرفتند.

ساختار اولیه پروتئین و ترجمه معکوس

پس از انتخاب مناسب ترین اپی‌توپ‌ها بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیک توالی مربوط به آنها به صورت یک ساختار اولیه خطی نوشته شدند. در ادامه با استفاده از پایگاه GenScript ترجمه ی معکوس برروی این ساختار انجام شد و توالی نوکلئوتیدی اپی‌توپ‌ها بدست آمد.

تعیین کدون نادر و بهینه سازی کدون

بهینه سازی (اپتیمایزکردن) کدون‌ها تکنیکی هست که باعث می‌شود بیان ژن در وکتور بیانی و سلول میزبان به مقدار قابل توجهی افزایش یابد.[۱۴] برای این کار از سرور GenScript استفاده شد.

جدول ۱: توالی های انتخاب شده از سویه‌های H1N1و H5N1 آنفولانزای استفاده شده

Accession number	سویه
AUR38654.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/California/07-00014/2009(H1N1))]
ABW06358.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Indonesia/175H/2005(H5N1))]
AGH55503.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/India/83093/2008(H5N1))]
ACE78908.1	hemagglutinin [InfluenzaAvirus (A/chicken/Turkey/Gercus 329/2007(H5N1))]
ABQ11261.2	hemagglutinin [Influenza A virus (A/green peafowl/Thailand/VSMU-3-CBI/2005(H5N1))]
CAP58149.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Denver/1957(H1N1))]
ARI46120.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/India/NH24/2016(H1N1))]
ARC53072.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Mexico/InDRE33/2016(H1N1))]
APO40383	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Babol/13992/2016(H1N1))]
ADM72795.1	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Thailand/34-9913/2010(H1N1))]

GenScript's Optimum Gene یک سیستم بهینه سازی ژن مبتنی بر PSO است که می‌تواند به منظور دستیابی به بالاترین سطوح بیان در هر سیستمی، سکانس‌های ژن توترکیب را تغییر دهد و مزیتی که نسبت به سایر پلت فرم‌ها دارد این است که انواع مختلفی از فاکتورهای مهمی که در مرحله بیان ژن مهم هست را در نظر می‌گیرد در صورتی که سایر پلت فرم‌ها فقط مبتنی بر جدول کدون‌ها هستند.[۱۵]

انتخاب وکتور و طراحی سازه نهایی

مرحله نهایی در این مطالعه، انتخاب وکتور برای بیان ژن مورد نظر و ساختار پروتئین مولتی اپی‌توپ انتخابی است. بدین منظور وکتور PET32a+ انتخاب شد. سیستم بیانی PET یکی از پرکاربرد ترین سیستم‌ها برای کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب است.[۱۴] سکانس پروتئین نوترکیب در محل برش‌های آنزیم‌های محدود کننده BamHI/XhoI وارد شد. توالی آنزیم BamHI در انتهای آمینی سکانس و توالی آنزیم XhoI در انتهای کربوکسیل سکانس قرار می‌گیرند.

نتایج

انتخاب اپی‌توپ

پس ازبررسی توالی های مورد مطالعه، اپی‌توپ‌هایی که از طریق آنالیز ژنی انتخاب شدند مورد بررسی قرار گرفتند و امتیاز آنها در blast ، در جدول شماره ۲ وارد شده است.

به منظور ارزیابی اتصال اپی توپ های انتخاب شده به مولکول های MHCI ، از سرور CTLpred استفاده شد. هرچه که میزان ایمنی زایی اپی توپ بیشتر باشد، امتیاز بالاتری به آن تعلق می گیرد و برای طراحی پروتئین های کاندید واکسن بهتر است. برطبق نتایج ارائه شده در جدول شماره ۳، قسمتی ازاپی توپ که بیشترین SCORE را دارد با رنگ قرمز مشخص شده است.

با استفاده از سرور IEDB ، اپی‌توپ‌هایی با بیش از ۱۵ آمینو اسید که قابلیت ارائه توسط مولکول های MHCII را داشتند موردارزیابی قرار گرفتند. برطبق نتایج ارزیابی اپی توپ های فوق که در جدول ٤ وارد شده است، اپی‌توپ‌های دارای SCORE کمتر که قابلیت اتصال بهتری دارند، برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

جدول ۲: لیست اپی‌توپ های انتخابی و امتیاز آنها در blast

اپی‌توپ	سویه	دومن حفظ شده	Score in blast
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSN	H5N1	دارد	96
RINHFEKIQIIPKSSWSSHEA	H5N1	دارد	72
LFGAIAGFIEIL	ALL	ندارد	34
MEKIVLLLA	H5N1	ندارد	32
CPYLGSPSF	H5N1	ندارد	32
KCQTPMGAI	H5N1	ندارد	33
IGTSTLNQR	H5N1	ندارد	30
SSWSYIVETPSSDNGTCYPG	H1N1	دارد	82
KKFKPEIAIRPKVRDQEGRM	H1N1	دارد	68
SLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTK	H1N1	دارد	77
NLNKKVDDGFLDIWTYN	H1N1	دارد	60
DDGFLDIWTYNAELLVL	H1N1	دارد	60
IWTYNAELLVLLENERT	H1N1	دارد	60
WTYNAELLVLLENERTLD	H1N1	دارد	93
LKNNAKEIGNGCFEFYH	H1N1	دارد	60
MESVKNGTYDYPKYSEE	H1N1	دارد	60

SLGAISFWMCSNGSLQ	H1N1	دارد	55
SFWMCSNGSLQCRICI	H1N1	دارد	60
CIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTV	H1N1	دارد	76
AGWILGNPECE	H1N1	ندارد	40
PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAAD	H1N1	دارد	100
ITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN	H1N1	دارد	80
ENLNKKVDDGF	H1N1	ندارد	38
HDSNVKNLYEKV	H1N1	ندارد	54
YQILAIYSTVASSLVL	H1N1	دارد	52
STDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	H1N1	دارد	70
GIHHPNDAA	H5N1	ندارد	47
KNLIWLVKK	H1N1	ندارد	33
KTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNL	H1N1	دارد	98
YEELREQLSSVSSFERFEIFPK	H1N1	دارد	74
VSLGAISFWMCS	H1N1	ندارد	71

جدول ۳: نتایج حاصل از ارزیابی ایمنی زائی اپی توپ های انتخابی در CTLpred و امتیاز تعلق گرفته به آنها

START POSITION	EPITOPE	SCORE	PREDICTION
16	GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSN	0.98	epitope
2	RINHFEKIQIIPKSSWSSHEA	0.82	epitope
3	LFGAIAGFIEIL	0.39	Non-epitope
1	MEKIVLLLA	0.41	Non-epitope
1	CPYLGSPSF	0.62	epitope
1	KCQTPMGAI	0.04	Non-epitope
1	IGTSTLNQR	0.13	Non-epitope
8	SSWSYIVETPSSDNGTCYPG	1	epitope
5	KKFKPEIAIRPKVRDQEGRM	0.99	epitope
3	SLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTK	0.79	epitope
4	NLNKKVDDGFLDIWTYN	0.48	Non-epitope
5	DDGFLDIWTYNAELLVL	0.53	epitope
3	IWTYNAELLVLLENERT	0.31	Non-epitope
3	WTYNAELLVLLENERTLD	1	epitope
6	LKNNAKEIGNGCFEFYH	0.97	epitope
8	MESVKNGTYDYPKYSEE	0.99	epitope
3	SLGAISFWMCSNGSLQ	0.90	epitope
4	SFWMCSNGSLQCRICI	0.98	epitope
12	CIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTV	0.89	epitope
2	AGWILGNPECE	0.19	Non-epitope
8	PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAAD	0.98	epitope
2	ITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN	0.38	Non-epitope
3	ENLNKKVDDGF	0.36	Non-epitope
2	HDSNVKNLYEKV	0.95	epitope
3	YQILAIYSTVASSLVL	0.89	epitope
2	STDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	0.60	epitope
1	GIHHPNDAA	0.54	epitope
1	KNLIWLVKK	0.79	epitope
9	KTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNL	0.99	epitope
7	YEELREQLSSVSSFERFEIFPK	0.99	epitope
4	VSLGAISFWMCS	0.96	epitope

جدول ٤: امتیاز اپی‌توپ های انتخاب شده از نظر قابلیت ارائه توسط مولکول های HLA انسانی

اپی‌توپ	الل انسانی	START	END	SCORE
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSN	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	1	15	2
RINHFEKIQIIPKSSWSSHEA	HLA-DRB1*08:02	5	19	0.66
SSWSYIVETPSSDNGTCYPG	HLA-DRB1*04:05	1	15	1.48
KKFKPEIAIRPKVRDQEGRM	HLA-DRB3*02:02	1	15	4.65
SLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTK	HLA-DRB5*01:01	1	15	0.59
NLNKKVDDGFLDIWTYN	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	3	17	0.51
DDGFLDIWTYNAELLVL	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	1	15	1.49
IWTYNAELLVLLENERT	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	1	15	0.24
WTYNAELLVLLENERTLD	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	1	15	0.28
LKNNAKEIGNGCFEFYH	HLA-DRB1*11:01	1	15	10.67
MESVKNGTYDYPKYSEE	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	3	17	15.03
SLGAISFWMCSNGSLQ	HLA-DRB1*04:01	2	16	5.83
SFWMCSNGSLQCRICI	HLA-DRB1*11:01	1	15	6.50
CIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTV	HLA-DRB1*04:01	1	15	6.17
PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAAD	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	3	17	1.03
ITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN	HLA-DRB4*01:01	5	19	3.84
YQILAIYSTVASSLVL	HLA-DRB1*07:01	2	16	0.01
STDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	HLA-DRB1*07:01	8	22	0.70
KTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNL	HLA-DRB5*01:01	16	30	0.64
YEELREQLSSVSSFERFEIFPK	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	6	20	0.04

تعیین اپی‌توپ‌های منتخب

پس از ارزیابی امتیاز اپی‌توپ‌ها و ارزیابی خصوصیات شیمیایی آن‌ها درحالت منفرد و در توالی، بهترین نتایج انتخاب و برای ساخت پروتئین نوترکیب استفاده شدند (جدول ۵). اپی‌توپ‌هایی که در آن‌ها اسیدآمینه آسپارژین گلیکوزیله بود شناسایی و به جای آن اسیدآمینه گلایسین قرار گرفت. نتایج نشان داد که فقط یکی از اپی‌توپ‌های انتخابی به صورت گلیکوزیله بوده ، اسیدآمینه مورد نظر در جدول شماره ۵ با علامت * نشان داده شده است.

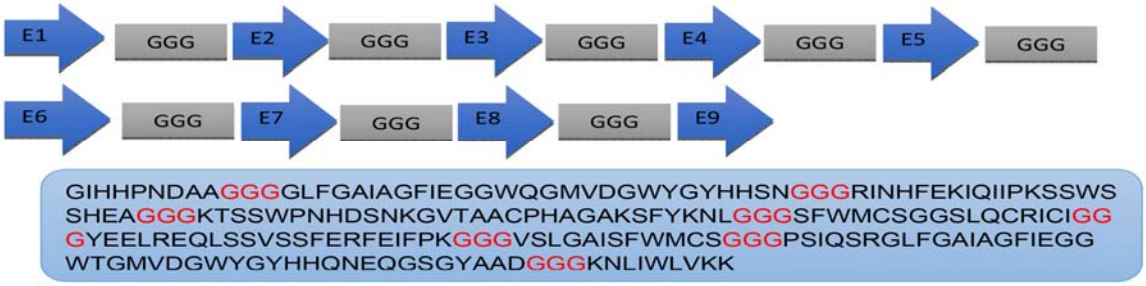
انتخاب اپی‌توپ‌ها و اتصال آن‌ها برای ساخت پروتئین نوترکیب

بعد از ارزیابی امتیاز اپی‌توپ‌ها ۹ اپی‌توپ انتخاب شدند. E1 الی E9 که چهار عدد از آن‌ها از سویه H5N1 و پنج عدد دیگر از سویه H1N1 هستند که در جدول شماره ٦ نشان داده شده است. به منظور اتصال اپی‌توپ‌ها به یکدیگر و ایجاد یک ساختار خطی اولیه در بین اپی‌توپ‌های انتخابی سه عدد گلایسین قرار داده شد که در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۵: اپی‌توپ‌های منتخب که در ساختار نهایی پروتئین نوترکیب استفاده شد.

اپی‌توپ	pH Isoelectric
GIHHPNDAA	6.04
KNLIWLVKK	10.98
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSN	5.01
RINHFEKIQIIPKSSWSSHEA	9.66
KTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNL	10
SFWMCSN*GSLQCRICI	7.8
YEELREQLSSVSSFERFEIFPK	4.33
VSLGAISFWMCS	3
PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAAD	4.41

*نشان دهنده اسید آمینه ای می‌باشد که گلیکوزیله بوده و به جای آن اسید آمینه گلایسین قرار داده شد.



شکل ۱: ساختار اولیه پروتیئن نوترکیب بر اساس اپی‌توپ‌های انتخاب شده

ارزیابی سکانس پروتئین

ساختار اولیه پروتئین توسط سرور pepcalc بررسی شد و نتایج در جدول ٦ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که وزن ملکولی پروتئین طراحی شده 22451.72 g/mol و دارای ٢١٤ اسیدآمینه است. pH ایزوالکتریک آن تقریبا در محدوده ی خنثی ٧ است (٧/٢٥)و بار الکتریکی آن در PH 7 ، ٠/٧می باشد.

میزان حلالیت پروتئین فوق در باکتری E.coli به میزان ١٠٠٪ تخمین زده شد. بااستفاده از نتایج به دست آمده ازسرور AlgPred ، پروتئین نوترکیب حاصل، با توجه به داشتن حد آستانه ٠/٤- و میزان امتیاز ٠/٤٠٤-، به عنوان غیر آلرژن گزارش شد. درصد منفی بودن آن ٧١/٢٤٪ و درصد مثبت بودن آن ١٨/٢١٪ است.

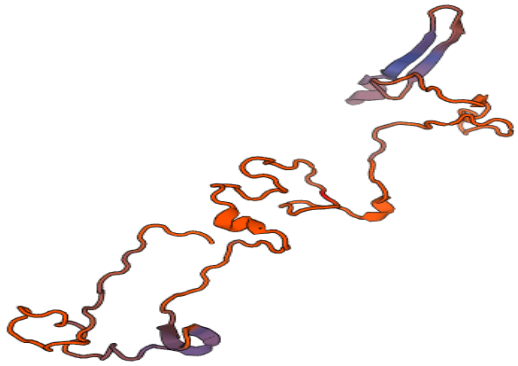
درنهایت ساختار پروتئین نوترکیب با استفاده از سرور https://swissmodel.expasy.org/ رسم شد(شکل ٢).

ترجمه معکوس ساختار اولیه

بعد از ارزیابی پروتئین، سکانس آمینواسید این ساختار ترجمه معکوس و تبدیل به سکانس نوکلوئیک اسید گردید. آنالیز بر روی توالی نوکلئوتیدی به منظور اپتیمایزیشن کدون (انتخاب بهترین کدون برای هر آمینواسید) و حذف کدون‌های نادر به منظور افزایش بیان پروتئین و بااستفاده از سرور GenScript انجام شد.

جدول ٦: خصوصیات فیزیکو شیمیائی پروتئین نوترکیب طراحی شده

parameters	Protein
Number of residues	214
Molecular weight	22451.72 g/mol
Extinction coefficient	60170 $M^{-1}cm^{-1}$
Iso-electric point	7.25
Net charge at pH 7	0.7



شکل ۲: نمای سه بعدی ساختار پروتئین نوترکیب طراحی شده

برطبق داده های به دست آمده، هر چه میزان CAI (شاخص انطباق کدون) به ١ نزدیک ترباشد، شرایط بیان پروتئین بهترخواهد بود. اگر میزان این عدد کمتر باشد شانس کمتری در میزان بیان ژن دارد. ابزار GenScript's Optimum Gene codon optimization باعث می‌شود با بهبود بخشیدن سکانس مقدار CAI را به بیش از ٠/٨افزایش دهد. ساختارهای Stem-loop که در اتصال mRNA به ریبوزوم و پایداری mRNA تاثیر می‌گذاشت شکسته شدند. میزان CAI برای توالی طراحی شده، ٠/٩٥ محاسبه شد. میزان محتوای GC نیز اپتیمایز گردید تا نیمه عمر mRNA افزایش یابد. با توجه به این که دامنه عددی درصد GC می‌بایست بین 30-70% باشد، درصد GC برای توالی فوق ٠٣/ ٥٩ محاسبه گردید (شکل ٣).

بحث

هدف از انجام این تحقیق طراحی واکسن مولتی اپی‌توپ آنفولانزا براساس مناطق بسیار محافظت شده پروتئین هماگلوتینین سویه‌های H1N1 و H5N1 می‌باشد که در طی زمان دچار تغییر و

موتاسیون نمی شوند. واکسیناسیون آنفولانزا مهمترین راه برای پیشگیری ابتلا به این بیماری است. دو راه اصلی برای واکسیناسیون وجود دارد: واکسن آنفولانزای غیر فعال تزریقی و واکسن آنفولانزای زنده ضعیف شده داخل بینی.[۱۶] Sridhar و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند پاسخ‌های ایمنی ناشی از ۲ نوع واکسن آنفولانزای غیر فعال تزریقی و واکسن زنده ضعیف شده داخل بینی ، برای نوع اول از ٦ ماهگی قابل استفاده است و براساس گلیکوپروتئین هماگلوتینین سطح ویروس می‌باشد و باعث القای پاسخ‌های آنتی بادی اختصاصی شده است. اما در مقابل واکسن‌های نوع دوم از ۲ تا ۱۷ سالگی مجاز می‌باشند و پاسخ‌های ایمنی با آنتی بادی سیستمیک ، موضعی و پاسخ‌های Tسل دارد اما به طور واضح حفاظتی ایجاد نکرده است.[۱۶] واکسن آنفولانزای سه گانه فصلی حاوی آنتی ژن‌های آنفولانزای غیر فعال و یا ویروس‌های آنفولانزای زنده ضعیف شده هستند که از دو سویه آنفولانزای A و یک سویه آنفولانزای B مشتق شده اند. واکسن‌های آنفولانزای چهار گانه نیز که اخیرا وارد بازار شده اند از یک سویه دیگر آنفولانزای B نیز تشکیل شده است.[۱۷] طراحی واکسن آنفولانزا به طور قابل توجهی با پیشرفت در بیوانفورماتیک و زیست شناسی محاسباتی تغییر کرده است.[۱۳] Kilbourne ED ، Schulman JL و همکاران در سال ۱۹۷۱ نشان دادند که استفاده از نوترکیبی ژنتیکی برای طراحی واکسن ویروسی با مشخصات مطلوب امکان پذیر است.[۱۸] واکسن‌های پپتیدی می‌توانند برای القای هر دو پاسخ ایمنی اختصاصی لنفوسیت B و لنفوسیت T در مقابل اپی‌توپ‌های محافظت شده استفاده شوند.[۱۷] Herrera-Rodriguez J و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که Vacc-FLU یک واکسن مبتنی بر پپتید است که ترکیبی از اپی توپ‌های محافظت شده می‌باشد. نتایج نشان داد که Vacc-FLU قادر به القای تولید IFN-γ از سلول‌های T و تولید آنتی بادی از سلول‌های B است.[۱۹]

به وسیله آنالیزهای in silico ساختار پروتئین هماگلوتینین برای ساختار واکسن مبتنی بر پپتید مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه پروتئین هماگلوتینین دو سویه H1N1و H5N1 بررسی شدند. سکانس‌های پروتئین با استفاده از متدهای ایمونوانفورماتیک مختلف ارزیابی شدند. در ابتدا ۳۱ اپی‌توپ از توالی پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفولانزا انتخاب شدند. در مراحل بعد ۹ اپی‌توپ که دارای بیشترین مقدار ایمونوژنیسیته و حلالیت بودند را انتخاب نمودیم و همچنین اپی‌توپ‌هایی انتخاب شدند که آلرژن نباشند. Y. Adar و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که استفاده از واکسن آنفولانزا بر پایه اپی‌توپ مقدار بسیار کمی IgE در مقایسه با واکسن‌هایی که در تخم مرغ تولید می‌شوند در موش‌های تزریقی ایجاد می‌کند که مقدار آن طبیعی است.[۹] چند سال بعد Woo EJ در سال ۲۰۱۵ نشان داد که گزارش‌هایی از واکنش‌های آلرژیک در افرادی که واکسن آنفولانزای نوترکیب فاقد تخم مرغ را دریافت کرده بودند دیده شده است و نتیجه گرفته شد که واکنش‌های آلرژیک به دنبال واکسیناسیون آنفولانزا فقط مربوط به اجزای پروتئین تخم مرغ نمی باشد.[۲۰] ما پروتئین نوترکیب را در سرور AlgPred بررسی نمودیم و نتایج نشان داد که توالی فاقد اپی‌توپ‌های آلرژن می‌باشد. حلالیت و بیان خوب پروتئین مورد نظر وابسته به ساختار اسید آمینه‌های پروتئین است بنابر این آنالیز سکانس اولیه در طراحی می‌تواند کمک کننده باشد در شرایطی که حلالیت کم باشد باعث mis-folding و اجتماع پروتئین مورد نظر در ساختارهایی به نام inclusion bodies می‌شود.[۲۱] در این مطالعه میزان حلالیت پروتئین مورد نظر ۱۰۰٪ می‌باشد.

ارزیابی پروتئین نوترکیب در سرور https://pepcalc.com نشان داد که وزن ملکولی آن 22451.72 g/mol با ۲۱٤ اسید آمینه است. Pedro Chan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که میزان بار توالی بر تولید پروتئین و حلالیت آن تاثیر می‌گذارد و نشان دادند که ممکن است بار مثبت اثرات نا مطلوبی بر پروتئین بگذارد.[۲۲] بررسی‌ها مشخص نمود pH ایزوالکتریک توالی ۷/۲۵ و میزان بار آن ۰/۷است که نشان دهنده خنثی بودن محصول نهایی می‌باشد بنابراین تاثیر خوبی بر میزان حلالیت و folding پروتئین می‌گذارد. Extinction coefficient (ضریب خاموشی) عددی است که برای هر پروتئین متفاوت می‌باشد و با استفاده از آن می‌توان نوع و میزان خلوص پروتئین نوترکیب را ارزیابی نمود.[۲۳] این عدد برای پروتئین نوترکیب طراحی شده در این مطالعه، ٦۰۱۷۰ $M^{-1}cm^{-1}$ به دست آورده شد.

بعد از بررسی‌های انجام شده، بر روی ساختار سکانس نهایی ترجمه معکوس صورت گرفت و به سکانس DNA تبدیل شد و در نهایت کدون‌ها اپتیمایز شدند. کدون اپتیمایزیشن نشان داد که CAI

۰/۹۵ است کـه بـرای بیـان پروکـاریوتی در بـاکتری *E.coli* بسـیار مناسب و قابل قبول است. در نهایت این سـکانس در وکتـور بیـانی Pcaiet32a+ با استفاده از آنزیم‌های محدود کننـده BamHI و XhoI قرار گرفت. براساس ساختار پروتئین نوترکیب طراحی شـده انتظـار مـی‌رود کـه ایـن واکسـن در مقابـل سـویه‌هـای H1N1 و H5N1 ایمنی‌زایی ایجاد کند.

References

1. Guo Y, He L, Song N, Li P, et al. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection. Microbes and infection 2017;19(12):641-7.
2. Guo C, Xie X, Li H, Zhao P, Zhao X, Sun J, et al. Prediction of common epitopes on hemagglutinin of the influenza A virus (H1 subtype). Experimental and molecular pathology 2015;98(1):79-84.
3. Duraes-Carvalho R, Salemi M. In-depth phylodynamics, evolutionary analysis and in silico predictions of universal epitopes of Influenza A subtypes and Influenza B viruses. Molecular phylogenetics and evolution 2018;121:174-82.
4. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. Nature medicine 2012;18(2):274-80.
5. Anwar T, Lal SK, Khan AU. Matrix protein 1: A comparative in silico study on different strains of influenza A H5N1 Virus. Bioinformation 2006;17253-6.
6. Zhao C, Xu J. Toward universal influenza virus vaccines: from natural infection to vaccination strategy. Current opinion in immunology 2018;53:1-6.
7. Bello M, Campos-Rodriguez R, Rojas-Hernandez S, Contis-Montes de Oca A, Correa-Basurto J. Predicting peptide vaccine candidates against H1N1 influenza virus through theoretical approaches. Immunologic research 2015;62(1):3-15.
8. Wu NC, Wilson IA. Structural insights into the design of novel anti-influenza therapies 2018;25(2):115-21.
9. Adar Y, Singer Y, Levi R, Tzehoval E, Perk S, Banet-Noach C, et al. A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. Vaccine 2009;27(15):2099-107.
10. Sheikh QM, Gatherer D, Reche PA, Flower DR. Towards the knowledge-based design of universal influenza epitope ensemble vaccines. Bioinformatics (Oxford, England) 2016;32(21):3233-9.
11. Sun Y, Shi Y, Zhang W, Li Q, Liu D, Vavricka C, et al. In silico characterization of the functional and structural modules of the hemagglutinin protein from the swine-origin influenza virus A (H1N1)-2009. Science China Life sciences 2010;53(6):633-42.
12. Altenburg AF, Rimmelzwaan GF, de Vries RD. Virus-specific T cells as correlate of (cross-)protective immunity against influenza. Vaccine 2015;3(4):500-6.
13. Wong TM, Ross TM. Use of computational and recombinant technologies for developing novel influenza vaccines. Expert review of vaccines 2016;15(1):41-51.
14. Ghorban Hosseini N, Tebianian M, Farhadi A, Hossein Khani A, Rahimi A, Mortazavi M, et al. In Silico Analysis of L1/L2 Sequences of Human Papillomaviruses: Implication for Universal Vaccine Design. Viral immunology 2017;30(3):210-23.
15. Schumacher M. https://www.genscript.com/codon-opt.html.
16. Sridhar S, Brokstad KA, Cox RJ. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. Vaccines 2015;3(2):373-89.
17. Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GF. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV 2015;94:251-63.
18. Kilbourne ED, Schulman JL, Schild GC, Schloer G, Swanson J, Bucher D. Related studies of a recombinant influenza-virus vaccine. I. Derivation and characterization of virus and vaccine. The Journal of infectious diseases 1971;124(5):449-62.
19. Herrera-Rodriguez J, Meijerhof T, Niesters HG, Stjernholm G, Hovden AO, Sorensen B, et al. A novel peptide-based vaccine candidate with protective efficacy against influenza A in a mouse model. Virology 2018;515:21-8.
20. Woo EJ. Allergic reactions after egg-free recombinant influenza vaccine: reports to the US Vaccine Adverse Event Reporting System. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2015;60(5):777-80.
21. Papaneophytou CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. Protein expression and purification 2014;94:22-32.
22. Chan P, Curtis RA, Warwicker J. Soluble expression of proteins correlates with a lack of positively-charged surface. Scientific reports 2013;3:3333.
23. Bagherieh F. Characterization of recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) protein by Extinction Coefficient Calculation. Jorjani Biomedicine Journal 2015;3(2):89-96.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2020, Vol. 9, No. 4: 395-404 *Original Article*

Farnaz Moghaddam[1], Morteza Taghizadeh[2], Reza Mansouri *[1], Majid Tebianian*[2], Mehran Dabaghian[2]

[1] *Department of Immunology, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran*

[2] *Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Karaj, Iran*

Designing of A Multi-epitope Recombinant Protein, Consisting of Several Conserved Epitopes from Hemagglutinin Protein of the H1N1 and H5N1 Strains of Influenza Virus by Immunoinformatics Approaches

Received:14 Oct 2019 ; Accepted: 5 Jul 2020

Abstract

Introduction: According to marked advances in bioinformatics studies, development of influenza vaccines has been greatly modified in many studies. In this study, we have designed a multi-epitope recombinant protein, consisting of several conserved epitopes from Hemagglutinin protein of the H1N1 and H5N1 strains of Influenza virus by immunoinformatics approaches.

Materials and Methods: The registered sequences of hemagglutinin proteins from H1N1 and H5N1 strains have been analyzed and selected epitopes have been chosen and directed for further analysis. After investigation of immunological and physicochemical parameters, the selected regions were fused together by linkers and sequence of target constructs was determined following codon optimization. The target construct has been integrated into BamHI/XhoI cleavage sites of PET32a+ expression vector.

Results: A physicochemical analysis revealed that the designed recombinant protein has 214 amino acid with molecular weight of 22.451 kDa. The isoelectric point was determined as 7.25 , solubility of 100% and Extinction coefficient of 60170 $M^{-1}cm^{-1}$.finally, after codon optimization, the Codon Adaptation Index (CAI) was calculated as 0.95.

Discussion: According to these results, it has been predicted that designed multiepitop recombinant protein has reasonable and unique immunological properties. The expressed protein could be used for future immunological studies against type A influenza virus.

Keywords: Influenza Virus, Immunoinformatics, Hemagglutinin, Multi-epitope

***Corresponding Author:**

Department of Immunology, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Karaj, Iran

Tel: 0912-5433684
0912-5134356
E-mail: majidtebianian@gmail.com
Rmansouri@ssu.ac.ir