

Prediction of Brucella omp25 and BLS antigens epitopes and their interaction with MHC molecules in sheep by in silico methods

Hashem Honar Haddadan

PhD Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: hashem.honarhadadan@mail.um.ac.ir

Mojtaba Tahmoorespur 

*Corresponding author. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: m_tahmoorespur@yahoo.com

Mohammad Hadi Sekhavati 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: hadisekhavati@gmail.com

Abstract

Objective

Brucellosis is a common disease between humans and livestock that has caused a great deal of damage to the livestock industry in recent years. One way to prevent this disease is to get a vaccine to immunize disease-prone herds. To produce a successful recombinant vaccine, factors such as: selecting the right adjuvant, selecting the right antigen and the right delivery system are very important. To this end, epitopes have recently been widely used in clinical research, biomedicine, and the production of recombinant vaccines. Surface proteins of this bacterium, including BLS and Omp25 proteins, have antigenic properties and play an important role in causing this disease. Due to the lack of effective vaccines, today the need to produce new and effective vaccines is felt more than ever. The aim of this study was to bioinformatically predict the epitopes of BLS and Omp25 genes of Brucella bacterium in order to introduce a suitable candidate for vaccine production.

Materials and Methods

For this purpose, SYFFPEITHI, PROPPRED and IEDB servers were used to predict epitopes. Since the three-dimensional structure of the protein is required to investigate the interaction of antigens with cell surface receptors, in the next step, the predicted epitopes were modeled using the Pepfold 3 server. In addition, in order to evaluate the stability of the predicted structures and

to ensure the accuracy of the third structure of the peptides, molecular dynamics simulations were performed using GROMACS software version 2019 and in a duration of 10 nanoseconds. Then, the three-dimensional structure was obtained by modeling homology method and the docking study of the interaction between epitopes with sheep MHCII and MHCI cells was performed using Autodock vina software.

Results

Then, in order to evaluate the stability of the complexes based on the results obtained from molecular docking, complexes with negative values of free binding energy were selected to perform molecular dynamics simulations. Finally, 8 peptides with better numbers were considered as suggested epitopes. The results obtained from molecular dynamics showed that the rmsd values for interleukin and interleukin bound to the polypeptide did not differ much in the two cases, so these results indicate that the activity of interleukin bound to the polypeptide did not change. The rmsf values also indicate the same stability in both proteins. Finally, the obtained results were evaluated in dynamic conditions in GROMACS software. The results of this study showed that in dynamic conditions, 4 predicted epitopes have high binding power to MHC class 1 and 2 receptors.

Conclusions

In addition, docking and molecular dynamics results showed that the polypeptide predicted in this study could be used as a candidate polypeptide in the design of a recombinant vaccine against brucellosis. However, to confirm these results, additional and laboratory studies are needed.

Keywords: Brucellosis, Recombinant vaccine, Molecular dynamic, Epitope

Paper Type: Research Paper.

Citation: Honar Haddadan H, Tahmoorespur M, Sekhavati M.H (2021) Prediction of Brucella omp25 and BLS antigens epitopes and their interaction with MHC molecules in sheep by in silico methods. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 19-34.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 19-34.

DOI: 10.22103/jab.2021.17658.1323

Received: August 18, 2020.

Accepted: September 16, 2020.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.


© the authors

پیش بینی اپی توپ های انتی ژن های omp25 و BLS باکتری بروسلا و برهمکنش آن ها با مولکولهای MHC در گوسفند به روش بیوانفورماتیکی

هاشم هنرحدادان


دانشجوی دکترا، گروه علوم دامی، دانش کده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران. را یا نا مه:

hashem.honarhadadan@mail.um.ac.ir

مجتبی طهمورث پور 

*نویسنده مسئول: استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران. رایانامه:

m_tahmoorespur@yahoo.com

محمدهادی سخاوتی 

دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران. رایانامه: hadisekhavati@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۷

چکیده

هدف: بیماری بروسلاز یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که در سال های اخیر خسارت های زیادی را به صنعت دامپروری وارد کرده است. یکی از راه های پیشگیری این بیماری تهیه واکسن است. برای تولید یک واکسن نو ترکیب موفق عواملی از جمله، انتخاب یک آنتی ژن مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می باشند. بدین منظور، اخیرا در تحقیقات بالینی، زیست پزشکی و تولید واکسن های نو ترکیب از اپی توپ ها در به طور گسترده ای استفاده می شود. پروتئین های سطحی این باکتری از جمله پروتئین های BLS و OMP25، دارای ویژگی های آنتی ژنیک بوده و نقش مهمی در ایجاد این بیماری بازی میکنند. با توجه به عدم وجود واکسن های موثر، امروزه نیاز به تولید واکسن های جدید و کارآمد بیش از پیش احساس می شود. هدف از این مطالعه، پیش بینی بیوانفورماتیکی اپی توپ های ژن های BLS و Omp25 باکتری بروسلا به منظور معرفی کاندید مناسب برای تولید واکسن بود.

مواد و روش ها: بدین منظور، جهت پیش بینی اپی توپ ها، از سرور های SYFFPEITHI، PROPRD و IEDB استفاده شد. سپس ساختار سه بعدی به دست آمد. سپس مدل سازی اپی توپ های پیش بینی شده با استفاده از سرور Pepfold 3 انجام

شد. به منظور بررسی پایداری ساختارهای پیش بینی شده و اطمینان از صحت ساختار سوم پپتیدها، شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار GROMACS ورژن ۲۰۱۹ و در مدت زمان ۱۰ نانو ثانیه انجام شد. به منظور بررسی پایداری کمپلکس ها، بر اساس نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی، کمپلکس های با مقادیر منفی تر انرژی آزاد اتصال، جهت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند. در نهایت نتایج به دست آمده، در شرایط دینامیکی در نرم افزار گرومکس مورد بررسی قرار گرفت. بررسی استاتیک برهمکنش بین اپی توپ ها با مولکول های MHC I و MHC II گوسفندی به کمک نرم افزار Autodock vina انجام شد.

نتایج: از بین نتایج به دست آمده از سرورهای مختلف، اپی توپ هایی انتخاب شده اند که در بین نتایج همه سرورها مشترک و دارای بهترین پارامترها بودند. در نهایت، ۸ پپتید که عددهای بهتری داشتند به عنوان اپی توپ های پیشنهادی در نظر گرفته شدند. نتایج به دست آمده از دینامیک مولکولی نشان داد که مقادیر rmsd برای اینترلوکین و اینترلوکین متصل به پلی اپی توپ در دو حالت تفاوت زیادی نداشته، لذا این نتایج بیانگر این موضوع است که فعالیت اینترلوکین متصل به پلی اپی توپ تغییر نمی یابد. مقادیر rmsf هم نشانگر پایداری یکسان در هر دو پروتئین می باشد. در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط دینامیکی، ۴ اپی توپ پیش بینی شده، دارای قدرت اتصال بالا به گیرنده های MHC کلاس ۱ و ۲ می باشند.

نتیجه گیری: علاوه بر این نتایج داکینگ و دینامیک مولکولی نشان داد که پلی اپی توپ پیش بینی شده در این مطالعه، می تواند به عنوان یک پلی اپی توپ کاندید در طراحی واکسن نو ترکیب بر علیه بیماری بروسلوز مورد استفاده قرار گیرد. هر چند که برای تایید این نتایج، نیاز به انجام مطالعات تکمیلی و آزمایشگاهی می باشد.

کلیدواژه ها: بروسلوز، واکسن نو ترکیب، دینامیک مولکولی، اپی توپ

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: هنرحدادان هاشم، طهمورث پور مجتبی، سخاوتی محمدادی (۱۴۰۰) پیش بینی اپی توپ های اتی ژن های omp25 و BLS باکتری بروسلا و برهمکنش آن ها با مولکولهای MHC در گوسفند به روش بیوانفورماتیکی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۳(۴)، ۳۴-۱۹.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بیماری بروسلوز، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک انسان و دام می‌باشد که سالانه بیش از ۵۰۰ هزار نفر در سرتاسر دنیا به آن مبتلا می‌شوند (Dean et al. 2012; Eini et al. 2012). این بیماری توسط گونه‌های مختلف از باکتری بروسلا به وجود می‌آید (Dean et al. 2012; Refai 2002). بروسلا یک باکتری گرم منفی و فاقد کپسول و اسپور است و قادر به آلوده کردن دامنه و سیعی از پستانداران می‌باشد (Pappas et al. 2005). تا کنون ۱۰ گونه از جنس بروسلا شناخته شده‌اند که عبارتند از: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. microti*, *B. incopinata*, *B. ceti* و *B. pinnipediali* (Guerra 2007; Franco et al. 2007). در ایران، رایج‌ترین گونه‌های باکتری بروسلا که ایجاد بیماری می‌کنند ۲ گونه *B. abortus* و *B. melitensis* می‌باشند (Pappas et al. 2005). *B. abortus* و *B. melitensis* به ترتیب عامل اصلی بیماری بروسلوز در گاو و گوسفند است که باعث سقط جنین و ناباروری در حیوانات بالغ می‌شود (Corbel 2006). در این مطالعه این دو گونه از باکتری بروسلوز مورد بررسی قرار گرفتند. این بیماری قابل سرایت به انسان نیز می‌باشد و علائمی مانند تب، ورم مفاصل و ... را به دنبال دارد. با توجه به عدم وجود درمان‌های مناسب در دام، دام‌های آلوده به این باکتری بعد از تشخیص، کشتار می‌شوند. که این امر خود باعث ضررهای اقتصادی فراوان به دامدار می‌شود (Pappas et al. 2005).

در دهه اخیر با توجه به اهمیت سلامت عمومی و آسیب‌های ناشی از این بیماری در صنعت دام، تلاش‌های زیادی برای کنترل و ریشه کن کردن این بیماری انجام شده است. یکی از راه‌های پیشگیری این بیماری تهیه واکسن به منظور ایمن‌سازی گله‌های مستعد بیماری است. از طرف دیگر، حیوانات اهلی به عنوان منبع مسمومیت مواد غذایی انسان شناخته شده‌اند (Ahsani et al. 2011). برای کاهش یا از بین بردن این خطر، باید راهکارهایی برای جلوگیری از ورود داروهای ضد عفونی کننده به زنجیره غذایی تدوین شود (Zarrabi et al. 2020). یکی از این راه‌ها شناسایی این عوامل بیماری‌زا و تهیه واکسن علیه آن‌ها است (Zarrabi et al. 2020). امروزه تهیه واکسن نوترکیب با روش‌های مهندسی ژنتیک، گام بزرگی در راه رسیدن به این هدف می‌باشد. به گونه‌ای که در دهه اخیر تولید یک واکسن موثر برای کنترل و حذف این بیماری یک چالش اصلی برای دانشمندان این حوزه محسوب می‌شود (Zowghi & Ebadi 1982; Mirnejad et al. 2013). برای تولید یک واکسن نوترکیب موفق عواملی از جمله: انتخاب یک اجزانت (عامل کمک کننده) مناسب، انتخاب یک آنتی ژن مناسب و یک سیستم تحویلی مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند (Yang et al. 2013; Dorneles et al. 2015). بدین منظور، اخیراً در تحقیقات بالینی، زیست پزشکی و تولید واکسن‌های نوترکیب از اپی توپ‌ها به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. امروزه آنتی ژن‌های مهم باکتری بروسلوز شناسایی شده‌اند که دو مورد از مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از آنتی ژن‌های OMP25 و BLS. OMP25 در زمان حمله باکتری به سلول میزبان، به عنوان پروتئین اولیه توسط بروسلا آزاد می‌شود (Jubier-Maurin et al. 2001). این پروتئین در اتصال و حمله به سلول‌های میزبان نقش دارد. توالی ژنی پروتئین OMP25 در پستانداران بسیار محافظت شده است. بنابراین، این پروتئین یک عامل مهم در بروز بیماری بروسلوز به حساب می‌آید (Edmonds et al. 2001; Edmonds et al. 2002).

BLS نیز آنتی ژن دیگری است که ویژگی های ایمنونژتیک داشته و در بین گونه های مختلف محافظت شده است. این آنتی ژن یک اجوانت موثر برای اتصال کوالانتهی به آنتی ژن های خارج سلولی می باشد (Cassataro et al. 2005). تهیه و تولید واکسن در گذشته نیازمند انجام آزمایش های ایمنولوژیک و بیوشیمیای متعددی بود که علاوه بر گران بودن، وقت گیر و برگشت ناپذیر نیز بوده است. اما امروزه با توجه به توسعه روش های بیوانفورماتیک، امکان مهندسی پروتئین، بررسی دقیق و معرفی کاندید مناسب برای تهیه واکسن با صرف هزینه و وقت کمتر فراهم شده است. از طرفی، کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) برای تعداد زیادی از ژن ها به خوبی شناسایی شده است و تنوع آلی آن در بیشتر مهره داران گزارش شده است (Ruzina et al. 2010). این ژن ها شامل سه کلاس هستند که از آن ها ژن های کلاس I و II بسیار چندشکل هستند (Baghizadeh et al. 2009; Ruzina et al. 2010). ژن های بسیار چندشکل کمپلکس اصلی سازگاری بافتی نقش اساسی در تشخیص ایمن پاتوژن ها و پارازیت ها بازی می کنند (Baghizadeh et al. 2009). با توجه به مطالب ارائه شده، هدف از این مطالعه، پیش بینی مهمترین اپی توپ های موجود در آنتی ژن های OMP25 و BLS باکتری بروسلا و بررسی اتصال اپی توپ های پیش بینی شده با استفاده از روش های استاتیک و دینامیک مولکولی به منظور معرفی کاندیدی برای تولید واکسن می باشد.

مواد و روش ها

گرفتن توالی پروتئین ها و پیش بینی اپی توپ ها: توالی آنتی ژن های OMP25 و BLS از پایگاه داده NCBI

جمع آوری شد. به منظور پیش بینی اپی توپ های مهم این دو آنتی ژن، از سرور های SYFFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>)، PROPPRED (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/proppred1/gloss.html>) و IEDB (<https://www.iedb.org>) که سرورهای آنلاین پیش بینی اپی توپ هستند استفاده شد. تمامی این سرورها نواحی که ماهیت اپی توپی دارند را پیش بینی می کنند و تفاوت آن ها فقط در الگوریتم شناسایی است نتایج به دست آمده از هر سرور، به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و انتخاب بهترین اپی توپ ها با استفاده از پارامترهای هر سرور انجام شد و اپی توپ هایی که در بین تمامی سرورها مشترک بودند و طبق رتبه بندی ارائه شده در هر سرور رتبه بالاتری داشتند انتخاب شدند.

پیش بینی ساختار سه بعدی: از آنجایی که به منظور بررسی برهمکنش آنتی ژن ها با رسپتورهای سطح سلول، نیاز به

ساختار سه بعدی پروتئین می باشد، در مرحله بعد، مدلسازی اپی توپ های پیش بینی شده با استفاده از سرور Pepfold 3 انجام شد. علاوه بر این، به منظور بررسی پایداری ساختارهای پیش بینی شده و اطمینان از صحت ساختار سوم پپتیدها، شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار GROMACS ورژن ۲۰۱۹ و در مدت زمان ۱۰ نانو ثانیه انجام شد.

با توجه به عدم وجود ساختار سه بعدی ر سپتور های MHCI و II گو سفندی، به کمک روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از سرور Swiss model ساختارهای فضایی مربوط به این ر سپتورها شبیه سازی شدند.

داکینگ مولکولی: در مرحله بعد به منظور بررسی بر همکنش بین اپی توپ های پیش بینی شده با ر سپتورهای MHCI و

MHCI گو سفندی در شرایط استاتیک، از نرم افزار (Trott & Olson 2010) Autodock vina استفاده شد و داکینگ مولکولی بین پپتیدها و ر سپتورها در شرایط استاتیک انجام شد.

سپس، به منظور بررسی پایداری کمپلکس ها، بر اساس نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی، کمپلکس های با مقادیر منفی تر انرژی آزاد اتصال، جهت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند.

شبیه سازی دینامیک مولکولی: در بخش شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس ها، از نرم افزار GROMACS

ورژن ۲۰۱۹ استفاده شد و هر یک از کمپلکس ها به طور جداگانه به مدت ۱۰ نانوثانیه در دمای ۵۰ درجه شبیه سازی شدند. به منظور کاهش خطا، فرآیند شبیه سازی برای هر کمپلکس با سه بار تکرار انجام شد.

طراحی پلی اپی توپ: در نهایت نیز به منظور بررسی ساختار پلی اپی توپی متصل به اینترلوکین گو سفندی، ساختار به هم

متصل بهترین کمپلکس ها با استفاده از سرور AIDA (<https://aida.godziklab.org>) پیش بینی شد و شبیه سازی دینامیک مولکولی نیز مشابه مراحل قبل صورت گرفت. سپس نتایج به دست آمده به منظور معرفی کاندید مناسب برای تولید واکسن، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

پس از اینکه توالی آنتی ژن های OMP25 و BLS از پایگاه داده NCBI جمع آوری شد، اپی توپ های مربوط به این دو

آنتی ژن با استفاده از سرورهای مختلف، به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. خروجی سرورها بدین صورت است که توالی های پیشنهادی و پیش بینی شده به عنوان اپی توپ را همراه با امتیازی که خود سرور محاسبه کرده است ارائه می کند. از بین نتایج به دست آمده از سرورهای مختلف، اپی توپ هایی انتخاب شده اند که در بین نتایج همه سرورها مشترک و دارای بهترین پارامترها و بالاترین رتبه ها بودند. انتخاب بدین صورت انجام شد که در ابتدا اپی توپ های مشترک انتخاب شدند و در نهایت از بین اپی توپ های مشترک، آن هایی که در لیست رتبه بندی دارای بالاترین امتیاز بودند انتخاب شدند. بر این اساس امتیازی که توسط سرورهای ۱ Propred، SYFPEITHI در نظر گرفته شده بزرگترین عدد برای اپی توپ احتمالی در میان سایر اپی توپ ها است، اما روش امتیازدهی در سرور IEDB به گونه ای است که هر چه عدد کمتر باشد، اپی توپ انتخابی دارای ارزش بالاتری است. انتخاب بهترین اپی توپ ها با استفاده از همپوشانی نتایج سرورهای مختلف، و با در نظر گرفتن پارامترهای مربوطه، صورت گرفت. در جدول ۱ توالی اپی توپ های پیش بینی شده آمده است.

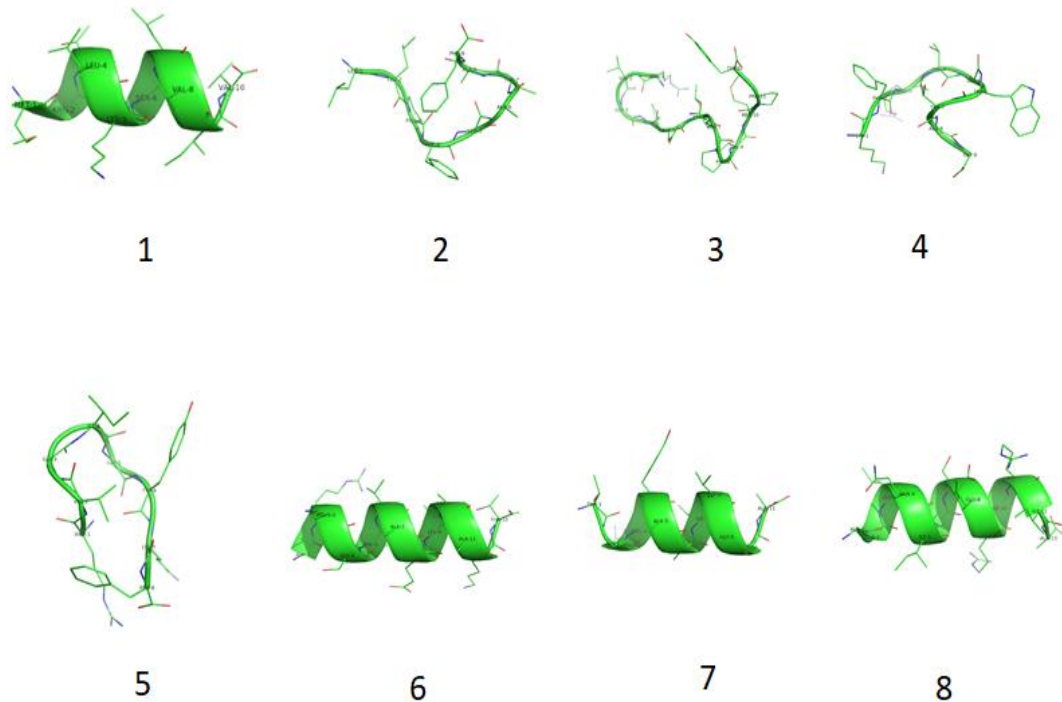
جدول ۱. توالی اپی توپ های پیش بینی شده

Table 1. Sequence of predicted epitopes

Sequence	توالی	Name	نام	Epitope's ID	شماره اپی توپ
MRTLKSLVIV		ام پی ۲۵	Omp25	1	
LLPFSATAF		ام پی ۲۵	Omp25	2	
RVGYDLNPVMPY		ام پی ۲۵	Omp25	3	
KFRVGWTAG		ام پی ۲۵	Omp25	4	
RVGIGYKF		ام پی ۲۵	Omp25	5	
ARKSFVAELAAKT		بی ال اس	BLS	6	
TGRYAAIVGAA		بی ال اس	BLS	7	
AALQIVSERSRIA		بی ال اس	BLS	8	

تا کنون چندین مطالعه با رویکردهای محاسباتی، اپی توپ های آنتی ژن مربوط به باکتری برو سلا را پیش بینی کرده و از این نتایج در مطالعه تجربی با هدف طراحی واکسن مبتنی بر اپی توپ استفاده کرده اند (Simon et al. 2010; Tahmoorespur et al. 2016). در این مطالعه، پس از اینکه بخش های آمینواسیدی که بیشترین احتمال اپی توپ بودن را برای MHC کلاس ۱ و ۲ داشتند توسط سرورها مشخص شد، بر اساس امتیاز، ۸ پپتید که عده های بهتری داشتند (جدول ۱) به عنوان اپی توپ های پیشنهادی در نظر گرفته شدند. سپس ساختار فضایی اپی توپ های انتخاب شده با سرور Pepfold 3 پیش بینی شد. سپس برای ارزیابی دقت پیش بینی ها، و انتخاب صحیح ترین ساختارهای سه بعدی، تمامی ساختارهای پیش بینی شده در شرایط دینامیکی با استفاده از نرم افزار گرومکس مورد ارزیابی قرار گرفت و بهترین ساختارها برای انجام داکینگ، انتخاب شدند (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ مشخص است، ساختارهای سوم اپی توپ ها بیشتر به صورت کوئل و مارپیچ آلفا می باشد. پیش از این نیز در مطالعات نشان داده شده است که مناطق کوئل بیشتر در نواحی سطح پروتئین قرار دارند، جایی که برای اتصال سطح به لیگاندها لازم است تا ساختار سطحی ایجاد شود و در این مناطق، احتمال تشکیل اپی توپ زیاد است (Li et al. 2013).

به منظور بررسی بر همکنش بین اپی توپ های پیش بینی شده با رسیپتورهای MHCII و MHCI گوسفندی در شرایط استاتیک، پس از انجام داکینگ مولکولی، نتایج به دست آمده به صورت جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بر این اساس، نتایج به دست آمده از نظر میزان انرژی اتصال و موقعیت اتصال مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱. ساختار سه بعدی از اپی توپ های پیش بینی شده. اپی توپ های ۱، ۶، ۷ و ۸ دارای ساختار مارپیچ آلفا و سایر اپی توپ ها دارای ساختار کویل می باشند

Figure 1. Three-dimensional structure of predicted epitopes. Epitopes 1, 6, 7 and 8 have an alpha helix and other epitopes have a coil structure

بر اساس داده های داکینگ مولکولی، ۸ کمپلکس (۴ تا از کمپلکس های مرتبط با MHC-1 و ۴ تا از کمپلکس های مرتبط با MHC-2) با مقادیر منفی تر انرژی آزاد اتصال جهت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب شد. از MHC1 کمپلکس های ۳ و ۴ و ۵ و ۷ و از MHC2 کمپلکس های ۲ و ۴ و ۵ و ۸ انتخاب و در بخش شبیه سازی پایداری کمپلکس بررسی شدند. نتایج به دست آمده از جدول ۲ نشان داد که اپی توپ های پیش بینی شده از قدرت بالایی برخوردار هستند. که این امر به دلیل پایین بودن انرژی اتصال می باشد که پیش از این نیز در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است (Shen et al. 2013; Agarwal & Mehrotra 2016). در بخش شبیه سازی دینامیکی، کمپلکس ها به مدت ۱۰ نانوثانیه در دمای ۵۰ درجه شبیه سازی شدند. انتخاب دمای بالاتر به علت کمک به جدا شدن اپی توپ از گیرنده است و اپی توپ هایی که در این شرایط همپان متصل به گیرنده باقی بمانند دارای اتصال قوی تر هستند. از پارامتر RMSD جهت تخمین میزان پایداری اتصال بین اپی توپ و کمپلکس استفاده شد. جذر میانگین مربع انحرافات یا همان RMSD نسبت به ساختار اولیه در طول شبیه سازی یکی از شاخص های مهم در دینامیک مولکولی مدل ها می باشد. در واقع RMSD، میزان انحراف موقعیت ذرات نسبت به موقعیت اولیه را در هر نقطه از زمان نشان می دهد. در حالت تعادل مقدار تغییرهای RMSD بایستی کم تر از ۲ آنگستروم باشد. هر قدر RMSD برای یک یا گروهی

از اتمها در طول شبیه سازی بیش تر باشد، میزان تغییرهای ساختاری آنها در طی شبیه سازی بیش تر خواهد بود. به عبارت دیگر میزان شیب نمودار RMSD نشان دهنده پایداری مدل در طول شبیه سازی دینامیکی است. هرچه شیب به صفر نزدیک تر باشد مدل شبیه سازی شده پایدارتر است و هرچه شیب به تدریج افزایش یابد یا نوسان زیادی داشته باشد مدل ناپایدارتر خواهد بود (Carugo & Pongor 2001).

جدول ۲. انرژی اتصال مربوط به نتایج داکینگ مولکولی

Table 2. Binding energy related to molecular docking results

شماره اپی توپ	انرژی اتصال Kcal/mol	کلاس MHC
Epitops ID	Binding energy	MHC classes
1	-6.7	1
2	-6.4	1
3	-9.5	1
4	-8.1	1
5	-9.2	1
6	-7.2	1
7	-7.5	1
8	-7.0	1
1	-6.7	2
2	-9.0	2
3	-7.0	2
4	-9.2	2
5	-9.2	2
6	-7.4	2
7	-7.6	2
8	-7.9	2

نمودارهای RMSD یکی برای اپی توپ تنها و یکی برای کل receptor مورد بررسی قرار گرفت. در مواردی که RMSD برای هم اپی توپ و هم گیرنده در یک حدود باشند، نشانگر پایداری کمپلکس خواهد بود (Van Der Spoel et al. 2005). اگر RMSD برای اپی توپ خیلی زیاد شود نشان می دهد اپی توپ در حال کنده شدن از گیرنده است. همچنین در تجزیه و تحلیل نتایج، از محاسبه تعداد پیوندهای هیدروژنی بین اپی توپ و گیرنده به عنوان یک شاخص از پایداری کمپلکس استفاده شد.

کم شدن تعداد پیوندهای هیدروژنی نشانگر ناپایداری کمپلکس مربوطه است (Chikalov et al. 2011). با توجه به مقادیر به دست آمده از مقدار RMSD و پیوندهای هیدروژنی در کلاس MHC1 اپی‌توپ‌های ۳ و ۴ دارای کمترین RMSD و کمترین کاهش در پیوندهای هیدروژنی بوده‌اند و در کلاس MHCII نیز اپی‌توپ‌های ۵ و ۸ همین شرایط را داشته‌اند (شکل ۲).



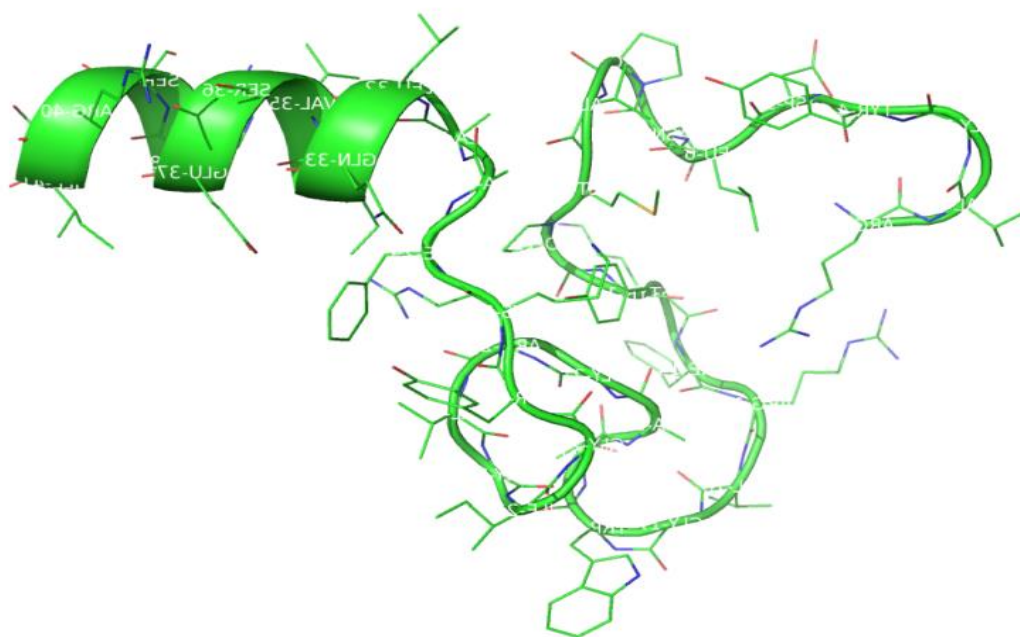
شکل ۲. نمودار RMSD و پیوند هیدروژنی به دست آمده از نتایج دینامیک مولکولی

Figure 2. RMSD diagram and hydrogen bond obtained from molecular dynamics results

بر همین اساس این اپی‌توپ از مجموع ۱۶ اپی‌توپ ابتدایی (۸ اپی‌توپ برای هر یک از کلاس‌های مولکول MHC) به منظور ایجاد پلی‌اپی‌توپ انتخاب شدند. به منظور تولید یک پروتئین کایمر، پلی‌اپی‌توپ به دست آمده (شکل ۳) به انتهای N از اینترلوکین گوسفندی متصل گردید. این کار با سرویس تحت وب AIDA صورت گرفت. به منظور بررسی تاثیر اتصال پلی‌اپی‌توپ به اینترلوکین، مجدداً از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی طبق شرایط قبل استفاده شد. یک بار اینترلوکین تنها و یک بار کایمر (شامل اینترلوکین متصل به پلی‌اپی‌توپ) شبیه‌سازی شد و نتایج هر دو مورد به طور کامل مقایسه گردید. نتایج به دست

آمده از دینامیک مولکولی نشان داد که مقادیر RMSD برای اینترلوکین و اینترلوکین متصل به پلی اپی توپ در دو حالت تفاوت زیادی نداشته، لذا این نتایج بیانگر این موضوع است که فعالیت اینترلوکین متصل به پلی اپی توپ تغییر نمی‌یابد (Carugo & Pongor 2001). مقادیر RMSF هم نشانگر پایداری یکسان در هر دو پروتئین می‌باشد (Hildebrand et al. 2019).

(شکل ۴).

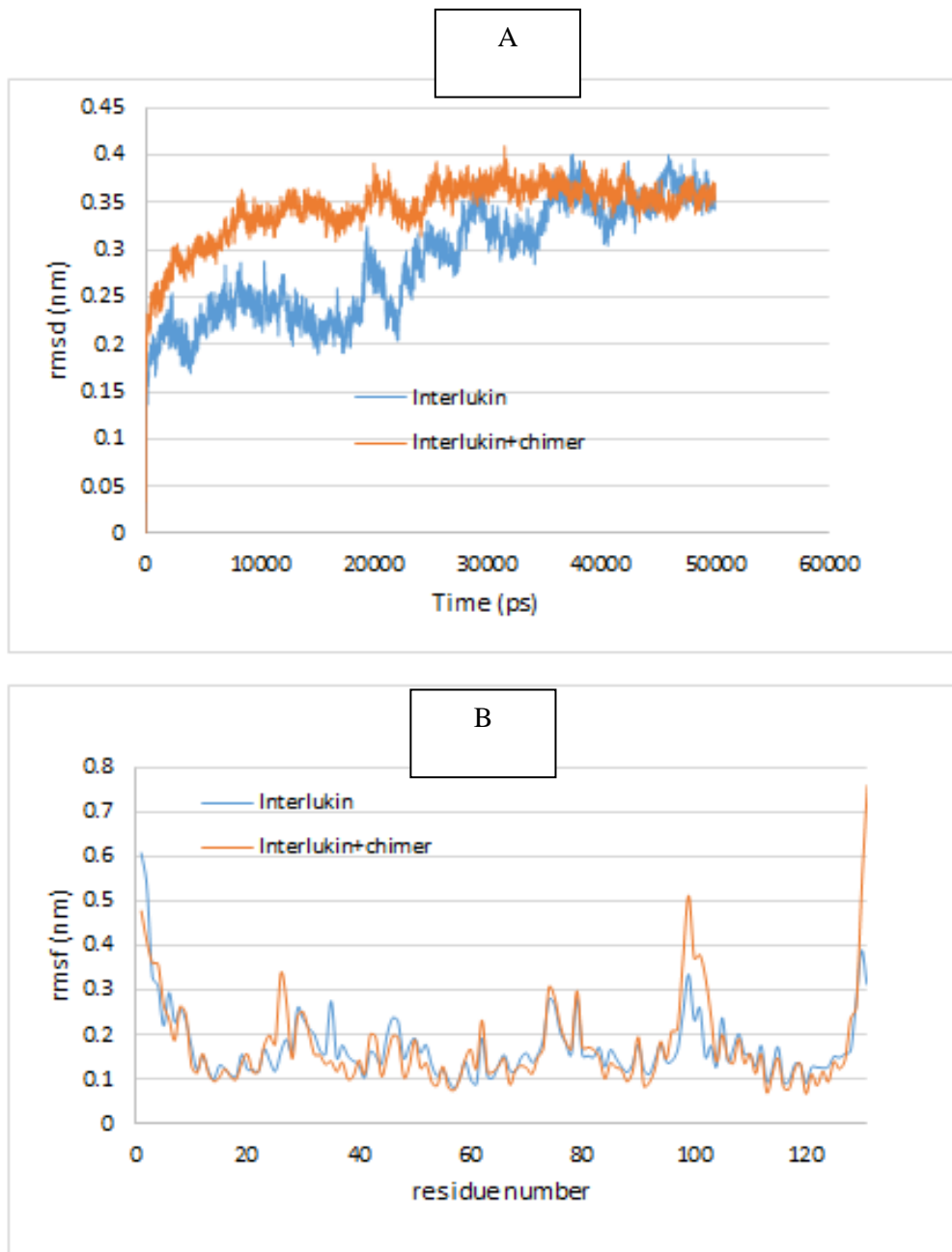


شکل ۳. ساختار پلی اپی توپ پیش‌بینی شده

Figure 3. Predicted polypeptide structure

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که پلی اپی توپ پیش‌بینی شده از قابلیت بالایی برای تولید واکسن علیه باکتری بروسلا برخوردار است و کاندید مناسبی می‌باشد، هرچند که برای تایید این نتایج، نیاز به انجام مطالعات تکمیلی و آزمایشگاهی می‌باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. نگارندگان بر خود لازم/فرض می‌دانند از خانم مرجان ازغندی به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.



شکل ۴. نتایج دینامیک مولکولی اینترلوکین و اینترلوکین متصل به پلی اپی توپ. شکل A نمودار RMSD و شکل B نمودار RMSF می باشد

Figure 4. Results of molecular dynamics of interleukin and interleukin attached to polypeptide. Figure A is the RMSD diagram and Figure B is the RMSF diagram

References

- Agarwal S, Mehrotra RJC (2016) An overview of molecular docking. *JSM Chem* 4(2), 1024-1028.
- Ahsani M, Bafti MS, Esmailizadeh A et al. (2011) Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Rumin Res* 95, 65-69.
- Baghizadeh A, Bahaaddini M, Mohamadabadi M et al. (2009) Allelic variations in exon 2 of Caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat. *Am-Eurasian J Agric Environment Sci* 6, 454-459.
- Carugo O, Pongor S (2001) A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Prot Sci* 10, 1470-1473.
- Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA et al. (2005) Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun* 73, 8079-8088.
- Chikalov I, Yao P, Moshkov M et al. (2011) Learning probabilistic models of hydrogen bond stability from molecular dynamics simulation trajectories. *BMC Bioinformatic* 12, 1-6.
- Corbel MJ (2006) *Brucellosis in humans and animals*. WHO.
- Dean AS, Crump L, Greter H et al. (2012) Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1865.
- Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP (2015) Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary Res* 46, 76.
- Edmonds M, Cloeckaert A, Hagijs S et al. (2002) Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Δ omp25 deletion mutant. *Res Veterin Sci* 72, 235-239.
- Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ et al. (2001) Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62, 1461-1466.
- Eini P, Keramat F, Hasanzadehhoseinabadi M (2012) Epidemiologic, clinical and laboratory findings of patients with brucellosis in Hamadan, west of Iran. *J Res Health Sci* 12, 105-108.

- Franco MP ,Mulder M, Gilman RH et al. (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 7, 775-786.
- Guerra H (2007) The brucellae and their success as pathogens. *Crit Rev Microbiol* 33, 325-331.
- Hildebrand PW, Rose AS, Tiemann JK (2019) Bringing molecular dynamics simulation data into view. *Trends Biochem Sci* 44, 902-913.
- Jubier-Maurin V, Boigegrain R-A, Cloeckert A et al. (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Inf Immun* 69, 4823-4830.
- Li Y, Liu X, Zhu Y et al. (2013) Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Exp Ther Med* 6, 335-340.
- Mirnejad R, Piranfar V, Mortazavi SM et al. (2013) A duplex PCR for rapid and simultaneous detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Asian Pac J Trop Med* 6, 453-456.
- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M et al. (2005) Medical Progress. *New Eng Jou of Med* 352, 2325-2336.
- Refai M (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veter Micr* 90, 81-110.
- Ruzina M, Shtyfurko T, Mohammadabadi M et al. (2010) Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian ,Kalmyk, and Yakut cattle breeds. *Russ J Genet* 46, 456-463.
- Shen M, Zhou S, Li Y et al. (2013) Discovery and optimization of triazine derivatives as ROCK1 inhibitors: molecular docking, molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Mol Biosyst* 9, 361-374.
- Simon GG, Hu Y, Khan AM et al. (2010) Dendritic cell mediated delivery of plasmid DNA encoding LAMP/HIV-1 Gag fusion immunogen enhances T cell epitope responses in HLA DR4 transgenic mice. *Plos One* 5, e8574.
- Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Yousefi S et al. (2016) In silico analysis of Omp25 and BLS *Brucella melitensis* antigens for designing subunit vaccine. *Arch Razi Inst* 71, 35-42.
- Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455-461.

- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26, 1701-1718.
- Yang X, Skyberg JA, Cao L et al. (2013) Progress in Brucella vaccine development. *Front Biol* 8, 60-77.
- Zarrabi A, Alipoor Amro Abadi M, Khorasani S et al. (2020) Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Mol* 25, 638.
- Zowghi E, Ebadi A (1982) Typing of Brucella strains isolated in Iran. *Arch Razi Inst* 33, 109-114.