Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Construction of a polyepitope vaccine against Newcastle disease by immunoinformatics design of immunogenic proteins

Zahra Roudbari

*Corresponding author: Zahra Roudbari, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Email: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

Abdolvahab Ebrahimpour Gorj

Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: av.ebrahimpour@yahoo.com

Arsalan Brazandeh

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Email: mabrazandeh@gmail.com

Abstract

Objective

Application of molecular biology techniques to the production of new vaccines against different strains of the Newcastle disease virus (NDV) has been the subject of recent research reports. Development of improved techniques for genome sequencing has led to the recognition of protective mechanisms and the identification of possible candidate antigens. The present research aimed to design a recombinant chimeric immunogen against binding agents in Newcastle virus in birds.

Materials and methods

Therefore, we conducted this investigation to make a recombinant vaccine in silico in order to control and eliminate this disease using anti-leptospirosis epitopes, F, and HN antigens. To bind these epitopes, KK, as AAY linkers, were selected to bind the structure. This structure contained 309 amino acids. The important biological factors of this recombinant vaccine, such as

physicochemical properties, different structures, stability, intrinsic protein disorder, solubility, and allergenicity of this vaccine structure were evaluated using immune system analysis.

Results

Various analyses confirmed the stability of this structure, and the epitopes predicted in the chimeric vaccine showed a high potential for inducing the immune response of B cell and T cell. Thus, immune system analysis revealed that the modeled multi-epitope vaccine could properly stimulate T and B cell immune responses and could potentially be utilized for prophylactic or control applications.

Conclusion

The results of this study could be employed to control and eliminate leptospirosis in the future after confirming its effectiveness by experimental immunological assays.

Keywords: Newcastle, Vaccine design, F and HN, Multi- epitope.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Roudbari Z, Ebrahimpour Gorji A, Barazandeh A (2021) Construction of a poly epitope vaccine against Newcastle disease by immunoinformatics design of immunogenic proteins. *Agricultural Biotechnology Journal* 13(2), 171-188.

Agricultural Biotechnology Journal 13(2), 171-188. DOI: 10.22103/jab.2021.17424.1309

Received: June 8, 2021. Accepted: July 10, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

ساخت واکسن پلی اپی توپی بر علیه بیماری نیوکاسل بوسیله طراحی ایمونوانفورماتیکی پروتئین های ایمنی زا

زهرا رودباری

*نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

عبدالوهاب ابراهیم پور گرجی

کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران. رایانامه: av.ebrahimpour@yahoo.com

ارسلان برازنده

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: mabrazandeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

چکیده

هدف: استفاده از تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی برای تولید واکسن‌های جدید علیه سویه‌های مختلف ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) موضوع گزارش‌های تحقیقاتی اخیر بوده است. توسعه تکنیک‌های بهبودیافته برای تعیین توالی ژنوم منجر به شناسایی مکانیسم‌های محافظتی و شناسایی آنتی‌ژن‌های احتمالی کاندید شده است؛ تحقیق حاضر با هدف طراحی یک اپی توپ نوترکیب در برابر عوامل اتصال در ویروس نیوکاسل در پرندگان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق برای ساختن واکسن نوترکیب از روش‌های بیوانفورماتیکی استفاده شده است تا با استفاده از آنتی‌ژن‌های ضد این ویروس، آنتی‌ژن‌های HN و F این بیماری را کنترل و از بین ببریم. برای اتصال این اپی توپ‌ها، از لینکرهای انعطاف‌پذیر مانند AAY و KK به‌عنوان پیونددهنده‌های ساختار انتخاب شدند. این ساختار حاوی ۳۰۹ اسیدآمینه است.

فاکتورهای مهم بیولوژیکی این واکسن نوترکیب مانند خصوصیات فیزیکی-شیمیایی، ساختارهای مختلف، پایداری، اختلال پروتئین ذاتی، حلالیت و حساسیت‌زایی این ساختار واکسن با استفاده از تجزیه‌وتحلیل سیستم ایمنی بدن ارزیابی شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل‌های مختلف پایداری این ساختار را تأیید کرد و اپی توپ‌های پیش‌بینی شده در واکسن نوترکیب پتانسیل بالایی را برای القای پاسخ ایمنی سلولB های و T نشان داد؛ بنابراین، تجزیه‌وتحلیل سیستم ایمنی نشان داد که واکسن چند اپی توپی می‌تواند به درستی پاسخ‌های ایمنی سلول T و B را تحریک کند و به طور بالقوه می‌تواند برای برنامه‌های پیشگیری یا کنترل استفاده شود. از نتایج این مطالعه می‌توان برای کنترل و از بین بردن بیماری نیوکاسل در آینده پس از تأیید اثربخشی آن با استفاده از روش‌های ایمونولوژیک تجربی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: طراحی واکسن، چند-اپی توپ، نیوکاسل، HN. F.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رودباری زهرا ، ابراهیم پور گرجی عبدالوهاب ، برازنده ارسلان (۱۴۰۰) ساخت واکسن پلی اپی توپی بر علیه بیماری نیوکاسل بوسیله طراحی ایمونوانفورماتیکی پروتئین های ایمنی زا. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۳(۲)، ۱۸۸-۱۷۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

طیور بزرگ‌ترین گروه حیوانات اهلی را تشکیل می‌دهند و تقریباً بیش از ۳۰ درصد پروتئین حیوانی مربوط به این گروه می‌باشد و لازم به ذکر است که تولید اصلی پروتئین حیوانی توسط طیور به‌صورت تجاری می‌باشد که فقط ۲۰ درصد از کل طیور موجود در جهان را شامل می‌شود (Permin et al. 2001)؛ بنابراین طیور از مهم‌ترین منابع تولید پروتئین حیوانی به شمار می‌رود. از طرف دیگر، حیوانات اهلی به عنوان منبع مسمومیت مواد غذایی انسان شناخته شده اند(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 راه ها شناسایی این عوامل بیماری‌زا و تهیه واکسن علیه آن‌ها است(Zarrabi et al. 2020). با توجه به این، بیماری‌های طیور اهمیت زیادی در تعیین سلامت جامعه دارند. یکی از عوامل مهمی که این صنعت را تهدید و سالانه خسارت زیادی به صنعت تولید پروتئین وارد می‌کند بیماری نیوکاسل می‌باشد. بیماری نیوکاسل یک بیماری

ویروسی[1] (NVD) که متعلق به خانواده پارامیکسوویریده و جنس ارتواوولاویروس (ویروس RNA دار با سنس منفی پوشش‌دار) می‌باشد. این بیماری قسمت‌های مختلف بدن پرندگان از جمله سیستم گوارشی تنفسی و عصبی را درگیر می‌کند (Awan et al. 1994).

یکی از عوامل مهم کنترل و پیشگیری این بیماری واکسیناسیون می‌باشد که نه‌تنها موجب کاهش تلفات می‌شود بلکه موجب کاهش میزان دفع ویروس به محیط نیز می‌گردد. واکسن‌ها به‌صورت زنده و یا به‌صورت کشته و غیرفعال برای کنترل بیماری نیوکاسل بکار می‌روند و با توجه به این نمی‌توان یک واکسن اقتصادی و مؤثر برای این بیماری برای همه پرندگان استفاده نمود که به دلیل تمایز سرولوژیکی بین پرندگان می‌باشد. برای حل این مشکل تلاش شده است تا واکسن بر اساس ویروس نوترکیب حاوی ژن‌های *fusion* (*F*) و *Hemagglutination Neuraminidase* (*HN*) طراحی و ساخته شود(Lee et al. 2008). پروتئین‌های *F* و *HN* آنتی‌ژن‌های محافظ هستند که اپی توپ‌های آن بر اساس MAbs[2] نقشه‌برداری شده است. چندین اپی توپ ساختاری پروتئین‌های *F* و *HN* و یک اپی توپ عمده خطی متشکل از ۳۴۵ تا ۳۵۳ اسیدآمینه پروتئین *HN* تعریف شده است (Gotoh et al. 1988).

در تحقیق انجام شده توسط Naohiro اثرات مثبت و پاسخ آنتی‌بادی از ژن‌های *F* و *NH* را در سویه‌های مبتلا به بیماری نیوکاسل مشاهده کردند (Naohiro et al. 1994). گلیکوپروتئین‌های *F* و *HN* بر روی پوشش ویروس وجود دارد و ویروس را قادر می‌سازد تا به سلول موردنظر متصل شده و وارد آن شود(Collins et al. 1993). امروزه در طراحی ایمونوژنها و واکسن‌های نوترکیب از بیوانفورماتیک استفاده می‌شود که در بردارندهٔ مطالعهٔ ساختارهای پروتئین‌های جدید و طراحی الگوریتم‌هایی برای پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول‌های B و T و همچنین بررسی پایداری ایمونوژنها است. از این راه زمان و هزینه لازم برای بررسی‌های آزمایشگاهی کاهش می‌یابد. استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، کمک زیادی به شناسایی ایمونوژنهای جدید می‌کند (María et al. 2017). تحقیق حاضر با هدف طراحی یک اپی توپ نوترکیب در برابر عوامل اتصال در ویروس نیوکاسل در پرندگان انجام شده است.

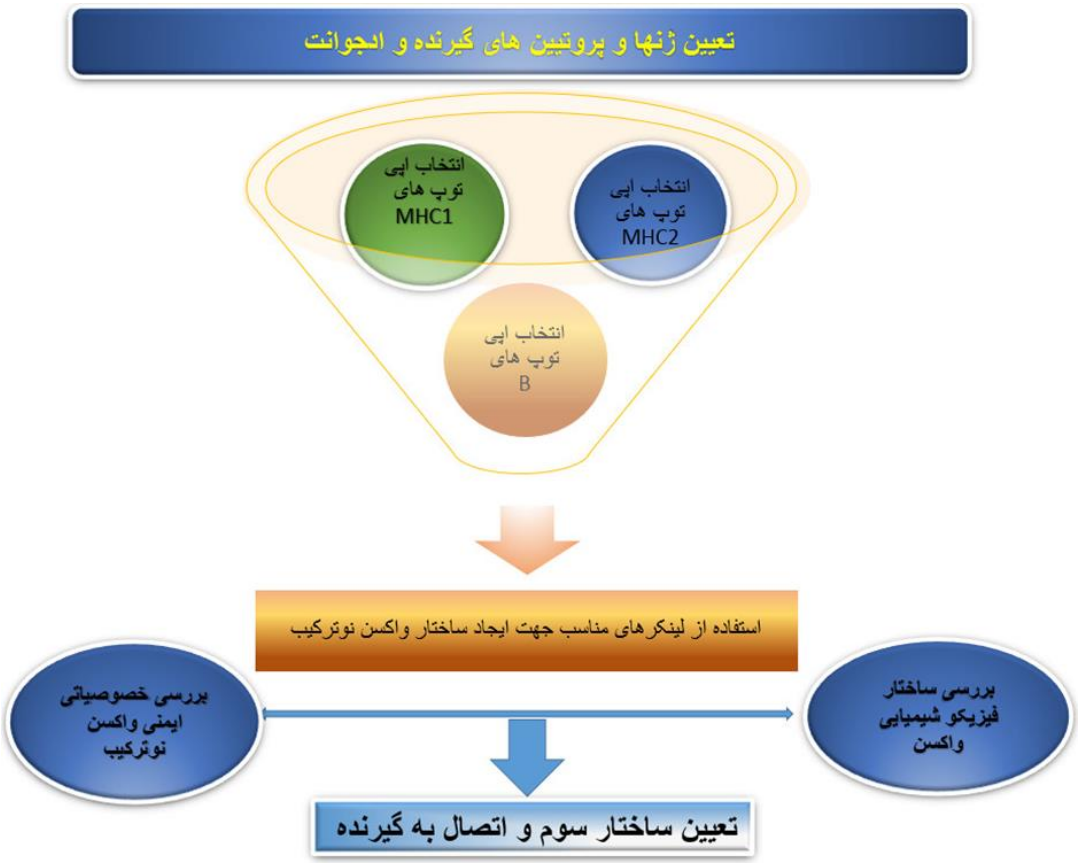
مواد و روش‌ها

طراحی تحقیق: در مطالعه حاضر جهت طراحی واکسن نوترکیب که حاوی اپی توپ‌های مختلف از ژن *F* و *HN* می‌باشد از نرم‌افزارهای مختلفی استفاده شده است. اپی توپ‌هایی مناسب که سلول‌های B ایمنی و سلول‌های T را تحریک می‌کنند استخراج شدن و سپس از پیونددهندهای مناسب برای اتصال این اپی توپ‌ها استفاده شد. برای شبیه‌سازی اتصال این ساختار به

1 Newcastle disease vaccine

2 monoclonal antibodies

گیرنده در داخل سلول که در این مطالعه BF2*0401 می‌باشد از نرم افزا PyMOL استفاده شده است. سرانجام، از سرورها و نرم‌افزارهای مختلفی برای ارزیابی واکسن نوترکیب استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار روش شماتیک برای طراحی واکسن نوترکیب

Figure 1. Schematic procedure chart for designing the recombinant vaccine

بازیابی توالی : توالی اسیدهای آمینه کامل *fusion protein*(*F*) (NP_071469.1)، *hemagglutinin-neuraminidase* (*HN*) (NP_071470.1) از سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) در قالب FASTA به دست آمده است.

پیش‌بینی اپی توپ‌های B و T: برای پیش‌بینی و انتخاب اپی توپ‌های آنتی‌بادی خطی و ناپیوسته مناسب جهت استفاده در ساختار واکسن از نرم‌افزار IEDB (https://tools.iedb.org/bcell/) استفاده شده است. (Peters et al. 2005) این نرم افزار تحت وب با استفاده از ابزارهای محاسباتی متمرکز بر پیش بینی و تجزیه و تحلیل اپی توپ سلول B و T را فراهم می کند. همه این ابزارها از طریق وب سایت عمومی آزادانه در دسترس هستند. همچنین این وب سرور بر اساس انعطاف‌پذیری، قابلیت دسترسی، آنتی‌ژنتیک و آب‌گریز بودن، اپی توپ را در پروتئین‌ها پیش‌بینی می‌کند (Emini et al. 1985). همچنین از

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

وب سرور IEDB در(https://www.iedb.org/) برای پیش‌بینی اپی توپ‌های سلولT که شامل MHC I و MHC II است، استفاده شد. برای پیش‌بینی MHC I، از الگوریتم پیشنهادی IEDB 2.19 و از آلل H-2-Db استفاده شده است. برای شناسایی نوع دوم سلول‌های T ایمنی (MHC II) در پروتئین‌های ایمنی‌زا انتخاب شده برای تولید واکسن، از وب سرور IEDB استفاده شده است که در آنها از آلل H2-IAb برای طیور استفاده شده است. در این نرم‌افزار معیار انتخاب اپی توپ‌ها کاندیدا امتیاز P-value بالاتر از ۰/۵ می‌باشد.

انتخاب اپی توپ و ساختار واکسن: پس از شناسایی اپی توپ برای سلول‌های B و T ، اپی توپ‌های غیر هم‌پوشانی با بالاترین امتیاز برای طراحی واکسن انتخاب شدند. این اپی توپ‌ها توسط اتصال‌دهنده‌های انعطاف‌پذیر AAY و KK به هم متصل شدند..

ارزیابی آلرژیک بودن ساختار واکسن نوترکیب: آلرژی شامل یک سری واکنشهای پیچیده در برابر عوامل خارجی و داخلی است که آلرژن نامیده می شوند و در ایجاد انواع بیماری ها نقش دارند. یکی از مهم‌ترین عواملی که هنگام طراحی واکسن باید در نظر گرفت واکنش‌های آلرژیک به واکسن است. از سرورهای مختلفی مانند AllerTOP 2.0، AlgPred و AllergenFP 1.0برای آزمایش آلرژی به این واکسن پپتید نوترکیب استفاده شده است. برای این منظور، سرور AlgPred در (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html) آلرژی زایی واکسن را بر اساس شباهت‌ها اپی توپ و پپتید ارزیابی می‌کند. این وب سرور با استفاده از الگوریتم های مختلف و ترکیب عملکرد آنها ۳۲۳ ماده حساسیت زا و ۱۲۵۱۰۱ ماده غیر حساسیت زا به دست آمده از Swiss-Port را مورد ارزیابی قرار می دهد (Saha & Raghava 2006). علاوه بر این، سرور AllerTOP (https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/) آلرژی زایی واکسن را در توالی پروتئین بر اساس تبدیل کوواریانس autocross (ACC) به بردارهایی با طول و شکل برابر ارزیابی می‌کند. همچنین این وب سرور آلرژن بودن مواد را بر اساس خصوصیات اصلی فیزیکی و شیمیایی پروتئین ها پیش بینی می کند (Dimitrov et al. 2013). در نهایت، سرور AllergenFP v.1.0 (https://ddgpharmfac.net/AllergenFP/) یکی دیگر از ابزار های بیوانفورماتیک است که بر اساس روش جدید اثر انگشت توصیفگر برای تعیین اینکه آیا واکسن نوعی حساسیت ایجاد می‌کند، استفاده می‌شود.

پیش‌بینی محتوای آنتی‌ژن واکسن چند اپی توپ: محتوای آنتی‌ژن واکسن نوترکیب را با استفاده از سرورهای مختلف (http://www.ddgpharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) ارزیابی شده است. VaxiJen اولین سرور پیش بینی مستقل از هم ترازی آنتی ژن های محافظ است. این هدف برای طبقه بندی آنتی ژن ها صرفاً بر اساس خصوصیات فیزیکو شیمیایی (Cut-off: 0.5) پروتئین ها بدون استفاده از هم ترازی توالی توسعه داده شد. از سرور می توان به تنهایی یا در ترکیب با روشهای پیش بینی مبتنی بر هم ترازی استفاده کرد.

ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی واکسن نوترکیب محلول: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مختلف واکسن که بر اساس اپی توپ‌های مختلف ایجاد می‌شود، با نرم‌افزار سرور ProtParam در آدرس اینترنتی (https://web.expasy.org/protparam/) مورد بررسی قرار گرفت. این نرم‌افزار خصوصیات مختلفی از جمله ترکیب اسیدهای آمینه و شاخص بی‌ثباتی، شاخص آلفاتیک و سایر شاخص‌های مهم را بررسی می‌کند (Gasteiger et al. 2005)

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی: ساختار سه‌بعدی واکسن نوترکیب با استفاده از I-TASSER در آدرس اینترنتی (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) (Yang & Zhang 2015) پیش‌بینی شد که برای برآورد مدل‌های پیش‌بینی شده از C-score استفاده می‌کند. یکی از محورهای اصلی این وب سایت توسعه روش های محاسباتی برای پیش بینی ساختار سه بعدی مولکول های پروتئین از توالی اسید آمینه و استنباط عملکردهای بیولوژیکی بر اساس الگوی توالی آنها می باشد. از دیگر قابلیت های این وب سایت ترکیب الگوریتم های محاسباتی و آزمایش های بیوشیمی برای طراحی مولکول های پروتئین جدید با قابلیت های پیشرفته فراتر از پروتئین های طبیعی است. سرور GalaxyRefine (http://galaxy.seoklab.org/refine) عملکرد کیفیت مدل پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار I-TASSER را افزایش می‌دهد.

اعتبار سنجی مدل انتخاب شده واکسن نوترکیب: به‌منظور اعتبار سنجی و ارزیابی ساختار واکسن نوترکیب از سه سرور استفاده شده است، از جمله ProSAweb، RAMPAGE و ERRAT. از وب سایت ProSAweb نمره Z کیفیت کلی مدل را نشان می دهد و مقدار آن در نمودار نمایش داده می شود که شامل نمرات Z تمام زنجیره های پروتئینی آزمایشگاهی تعیین شده در ساختار پروتیین فعلی است در این طرح ، گروه های سازه از منابع مختلف (اشعه ایکس ، NMR) با رنگ های مختلف تشخیص داده می شوند. می توان از آن برای بررسی اینکه آیا نمره Z ساختار ورودی در محدوده امتیازاتی است که معمولاً برای پروتئین های بومی با اندازه مشابه یافت می شود ، استفاده کرد. برای تأیید ساختار و ترکیب پروتئین (Wiederstein & Sippl 2007) و همچنین نقشه (https://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php) زاویه‌های phi و psi برای هر اسیدآمینه در پپتید نوترکیب با راماچاندران محاسبه شد. در خصوص سرور راماچاندران باید اشاره کرد که این سرور از مدل های رایانه ای پلی پپتیدهای کوچک برای تغییر سیستماتیک phi و psi با هدف یافتن ترکیبات پایدار استفاده می کند. در ترکیب هر ساختار برای تماس نزدیک بین اتم ها مورد بررسی قرار می گیرد (Lovell et al. 2003). سرانجام، از نرم‌افزار سرور ERRAT (https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/) برای تعامل غیرپیوندی بین انواع مختلف اتم‌ها استفاده شده است. ERRAT اصطلاحاً "عامل کلی کیفیت" برای فعل و انفعالات اتمی غیر پیوندی است که نمرات بالاتر نشانگر کیفیت بالاتر است. محدوده پذیرفته شده عمومی برای مدل با کیفیت بالا> ۵۰ است (Colovos & Yeates 1993).

اتصال مولکولی واکسن چند اپی توپ با BF2*2101: اتصال مولکولی واکسن ساخته شده با BF2*0401 (4g42.pdb) و شماره دسترسی NCBI (NP_001026509.1) با سرور Cluspro 2.0 انجام شد. در آدرس

اینترنتی (http://cluspro.bu.edu/login.php) موجود اســت. به‌منظور ارزیابی میل اتصــال لیگاند پروفایل و BF2*0401. این سرور می‌تواند کل پروتئین را به یکدیگر به رو شی سریع و اتوماتیک مت صل کند (Vajda et al. 2017). در نهایت، نتیجه ات صال با ا ستفاده از نرم‌افزار PyMOL م صور سازی شد. PyMOL یک ابزار گرافیکی مولکولی کراس پلتفرم ا ست و به طور گسترده ای برای تجسم سه بعدی ماکرومولکول ها مورد استفاده قرار می گیرد. ابزارهایPyMOL به طور گسترده توسط پلاگین های مختلف، از جمله تجزیه و تحلیل ماکرومولکولی، مدل ســازی همســانی ، اتصــال پروتئین-لیگاند و مدل ســازی فارماکوفور افزایش یافته است(Janson et al. 2017).

نتایج و بحث

تجزیه‌وتحلیل اولیه توالی پروتئین نامزد واکسن نوترکیب: در مطالعه حا ضر، پروتئین‌های، *F* و *HN* به ترتیب با ۵۵۳ و ۵۷۷ و ا سیدآمینه به‌عنوان پروتئین‌های ایمنی‌زا برای طراحی واک سن نوترکیب انتخاب شدند. توالی این پروتئین‌ها از پایگاه داده NCBI به دست آمده است. پس از شناسایی اپی توپ‌های مختلف پروتئین‌های *F* و*HN*، این توالی اسیدهای آمینه کوتاه با دو اتصال‌دهنده انعطاف‌پذیر AAY و KK به یکدیگر وصل شدند (شکل ۲).

SGLITGNPILYDSQTQLLGIAAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQEAAYCKMTTCRCVNPPG
IISQNYGAAYSTTRGFASALVPKVVAAYALGVATAAQITAAAAAAAYTVFGPQITSPA
LNKLAAYLAGGNMDYLAAYKQSCNVLSLAAYTSPALNKLTIKKIPAPTTGSGCTRIP
SFDMSAKKFGDWVANYPGVGGGSFIDSRKKSKATETEEEDYNSAVPTRMVKKTVPP
NTVTLKKLALLNTETTIMKKFSPALLYPMKKSLLYSMGASTPSDLVKKTSLSYQING
AANNSGKKQEHLNFIPAPTTGSG

شکل ۲. ساختار توالی واکسن نوترکیب. رنگ آبی نشان‌دهنده اپی توپ‌های پروتئین F و رنگ قرمز مربوط به اپی توپ‌های پروتئینHN و رنگ سبز پیونددهنده های مختلف بین اپی توپ‌ها می‌باشند

Figure 2. Amino acid sequence of the recombinant vaccine. Blue indicates protein F epitopes, red indicates HN protein epitopes, and green indicates different linkers between epitopes

ساختار نهایی واک سن نوترکیب: با اســتفاده از نرم‌افزار IEDB، اپی توپ‌ها پروتئین‌هایی برای ســلول‌های B و T (MHC I and MHC II) براساس ویژگی آنتی‌ژنتیکی، قابلیت دسترسی سطح، انعطاف‌پذیری، آب دوستی و پیش‌بینی‌های اپی توپ خطی انتخاب شــدند (جدول ۱). نه تا اپی توپ غیر هم‌پوشــان مربوط به هر پروتئین با بالاترین امتیاز انتخاب و با اســتفاده از پیوند دهنده‌های مناســب به یکدیگر اتصــال داده شــد. واکســن نوترکیب نهایی شــامل ۳۰۹ اســیدآمینه اســت (شــکل ۲) که برای تجزیه‌وتحلیل بعدی ارزیابی شد.

جدول ۱. اپی توپ‌های مورداستفاده در ساختار واکسن نوترکیب پس از پیش‌بینی در سلول‌های ایمنی B وT

Table1. Epitopes used in recombinant vaccine structure after prediction in B and T immune cells

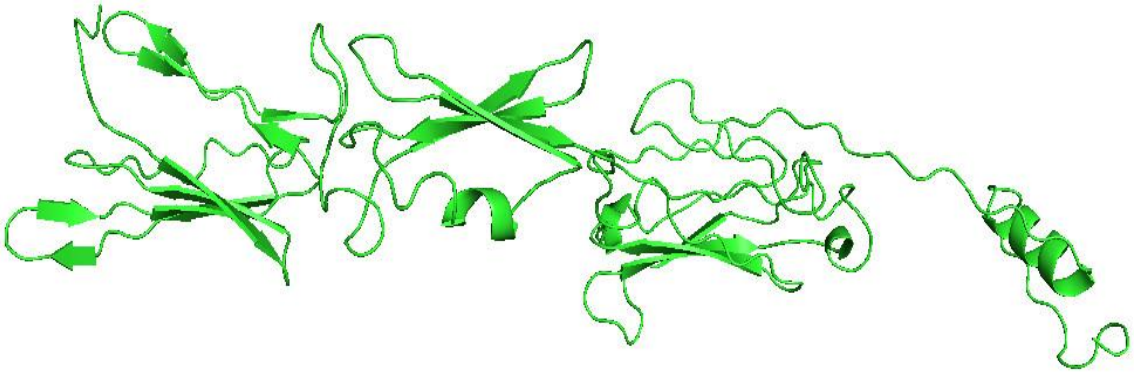
آنتی‌ژن Antigen	شروع و پایان جایگاه Start–end position	توالی Sequences	طول اپی توپ length of peptides
F T MHC1	31-39	LAGGNMDYL	9
F T MHC1	1-9	KQSCNVLSL	9
F T MHC1	16-25	TSPALNKLTI	10
F T MHC2	29-43	STTRGFASALVPKVV	15
F T MHC2	127-141	ALGVATAAQITAAAA	15
F T MHC2	219-233	TVFGPQITSPALNKL	15
F B -cell	394-414	CKMTTCRCVNPPGIISQNYG	20
F B -cell	266-286	SGLITGNPILYDSQTQLLGI	20
F B -cell	85-105	NRTLTTLLTPLGDSIRRIQE	20
HN T MHC1	39-47	TVPPNTVTL	9
HN T MHC1	24-34	LALLNTETTIM	11
HN T MHC1	1-9	FSPALLYPM	9
HN T MHC2	43-57	SLLYSMGASTPSDLV	15
HN T MHC2	108-122	TSLSYQINGAANNSG	15
HN T MHC2	17-31	QEHLNFIPAPTTGSG	15
HN B -cell	163-183	IPAPTTGSGCTRIPSFDMSA	20
HN B -cell	292-312	FGDWVANYPGVGGGSFIDSR	20
HN B -cell	252-272	SKATETEEEDYNSAVPTRMV	20

آلرژی و آنتی‌ژنی واکسن نوترکیب: به منظور ارزیابی میزان حساسیت‌زایی واکسن نوترکیب از نرم‌افزار AllerTOP ، AlgPred و AllergenFP 1.0 ا ستفاده شد. نتایج به د ست آمده ن شان داد که واک سن نوترکیب هیچگونه آلرژی زایی ایجاد نکرده است. علاوه بر این، آنتی‌ژنی این واکسن نوترکیب با استفاده از سرور VaxiJen v2.0 به میزان ۰/۴۷ پیش‌بینی شد.

خواص فیزیکی و شیمیایی واکسن: برای ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی واکسن انتخاب شده از سرور ProtParam استفاده شد. نتایج نشان داد که این ساختار حاوی ۳۰۹ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۳۲۶۲۲۶۰ و نقطه ایزوالکتریکی نظری (Theoretical PI) برابر با ۹/۶۳ است. تعداد کل اتم‌های این واکسن نوترکیب ۴۶۲۹ بود که کربن با ۱۴۵۴، هیدروژن با ۲۳۳۹، نیتروژن با ۳۸۵، اکسیژن با ۴۳۹ و در نهایت گوگرد با ۱۲ اتم از عناصر تشکیل‌دهنده این ساختار هستند. علاوه بر این، گلوتامین و اسید آسپارتیک اسیدهای آمینه با بار منفی بودند (تعداد بار منفی = ۱۵) در حالی که اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین اسیدهای آمینه

با بار مثبت بودند (شماره بار مثبت = ۳۲). نیمه‌عمر این ساختار در بدن پستانداران، مخمر و *E. coli* به ترتیب > ۱/۹، > ۲۰ و > ۱۰ ساعت پیش‌بینی‌شده است.

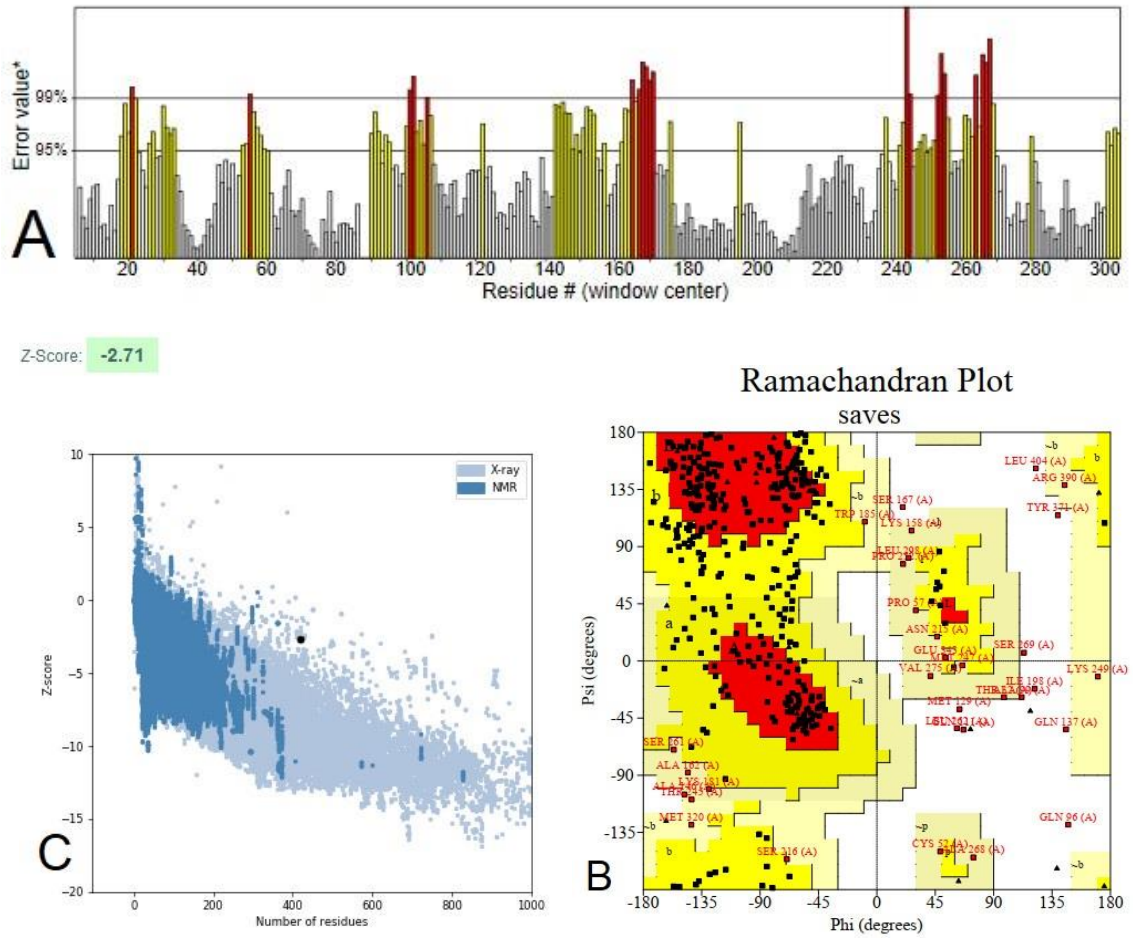
پیش‌بینی و اعتبارسنجی ساختار سوم: I-Tasser سروری است برای پیش‌بینی ساختار سوم اپی توپ‌های استفاده می‌شود. این سرور بر اساس C-score پنج مدل با بیشترین امتیاز را پیش‌بینی کرده است. از میان این پنج مدل، مدل شماره ۱ با C-Score = 1.7 به‌عنوان بهترین مدل برای ادامه تجزیه و تحلیل انتخاب شد (شکل ۳). علاوه بر این، کیفیت ساختار پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار PROSA بررسی شد. بر این اساس، کیفیت ساختار پروتئین در محدوده پروتئین‌های متبلور یا تشخیص‌داده‌شده با روش تشدید مغناطیسی هسته‌ای (NMR) بود (شکل ۴). بررسی طرح راماچاندران در مدل پیش‌بینی‌شده توسط سرور SAVES v6.0 حاکی از آن است که تقریباً ۲۰۹ اسیدآمینه (۵۶/۹٪) در مناطق مطلوب قرار دارند، ۱۲۸ اسیدآمینه در مناطق مجاز اضافی (۳۴/۹٪) و ۱۱ اسیدآمینه (۳٪) در مناطق ممنوع است. برای ارزیابی کیفیت مدل پیشنهادی از نرم‌افزار ERRAT استفاده شد و نتایج نشان داد که ضریب کیفیت کلی ساختار پیشنهادی ۰/۹ است.



شکل ۳. ساختار سه‌بعدی واکسن نوترکیب

Figure 3. Three-dimensional structure of the recombinant vaccine

اتصال مولکولی واکسن چند اپی توپ با گیرنده BF2*0401: اتصال مولکولی واکسن چند اپی توپ با BF2*0401 با استفاده از Cluspro 2.0 مورد ارزیابی قرار گرفت و در مجموع ۱۲۰ مدل برای خصوصیات بیوفیزیکی گیرنده (BF2*0401) و لیگاند (واکسن چند اپی توپی) پیشنهاد گردید. از میان این مدل‌ها، فقط یک مدل انتخاب شده و به گیرنده متصل شده است. شبیه‌سازی این اتصال با استفاده از PyMol انجام گردید (شکل ۶).



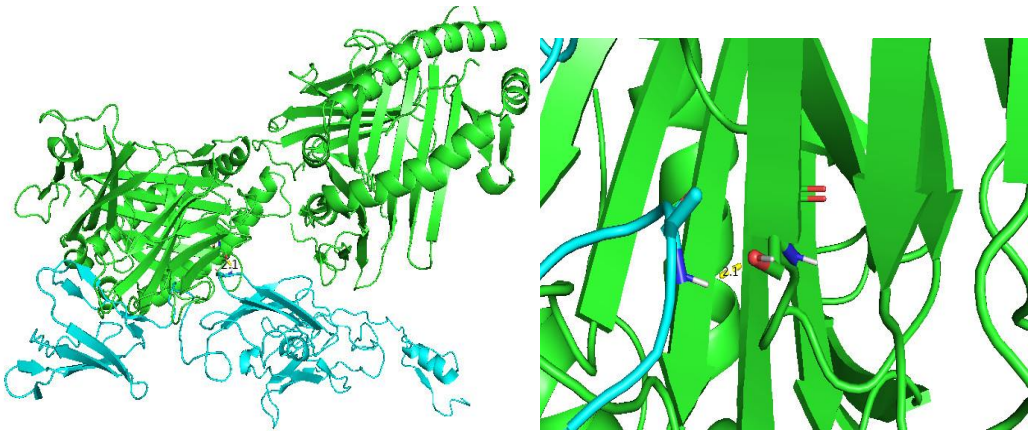
شکل ٤. A: نمودار ERRAT, B: نمودار Ramachandran و C: کیفیت ساختار پیش‌بینی‌شده توسط سرور PROSA. ضریب کیفیت کلی مدل نهایی ۹۹ درصد است. مقادیر حدود ۹۵ درصد یا بالاتر معمولاً وضوح بالای سازه‌ها را نشان می‌دهند

Figure 4. A: ERRAT plot, B: Ramachandran plot and C: quality of the structure predicted by the PROSA server. The overall quality factor of the final model is 99%. Values around 95% or higher usually show high resolution of structures

بحث

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های شایع در صنعت طیور بوده و خسارات اقتصادی جدی را به این صنعت وارد می‌کند. بعد از بروز بیماری نیوکاسل در انگلستان در سال ۱۹۳۳ ، واکسن H از سویه بیماری‌زا، به‌عنوان اولین واکسن تهیه گردید. به دنبال آن سویه Hitchner B1 و لا سوتا از ویروس‌های غیر بیماری‌زای مزرعه به‌عنوان واکسن معرفی و مصرف شد (Alexander et al. 2004). رعایت کامل اصول بهداشت و واکسیناسیون مناسب، ازجمله راه‌های پیشگیری از این بیماری‌ها است. تکنیک‌های

متداول تولید واکسن نیاز به پرورش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و شناسایی اجزای ایمنی‌زا دارد که زمان‌بر هستند و فقط می‌توانند آنتی‌ژن‌هایی را که بسیار تولید و خالص هستند تشخیص دهند. در همین حال، فراوانی پروتئین همیشه شامل ایمنی‌زایی نیست و گاهی اوقات آنتی‌ژن‌های تولید شده در داخل بدن در طی پاتوژنز نمی‌توانند در شرایط آزمایشگاهی تولید شوند. از طرف دیگر، از چنین روش‌هایی نمی‌توان برای میکروارگانیسم‌های غیر قابل‌کشت استفاده کرد (Arnon & Ben-Yedidia 2003; Temizoz et al. 2016). بنابراین، پیشرفت‌های مربوط به تعیین توالی ژنوم و ظهور بیوانفورماتیک، روش‌های جدیدی را برای مطالعه آنتی‌ژن‌های محافظ، از جمله واکسینولوژی معکوس معرفی کرده است.



شکل ۵. مدل اتصال گیرنده (BF2*0401) و پروتئین نوترکیب به دست آمده توسط Cluspro 2.0. گیرنده به رنگ سبز و لیگاند با رنگ آبی روشن نشان داده شده‌اند. برای شبیه‌سازی این اتصال از نرم‌افزار Pymol استفاده شد

Figure 5. Docking model of a BF2*0401 molecule and fusion protein obtained by the Cluspro 2.0. A BF2*0401 and ligand are shown in green, red and light blue, respectively. Pymol software was used for visualization of Docked model. (Color figure online)

برای کاهش شیوع بیماری نیوکاسل، پروتئین‌هایی مانند *F* و *HN* را برای طراحی واکسن نوترکیب انتخاب کردیم که کاندیداهای بالقوه‌ای برای طراحی واکسن بودند. بر اساس اپی توپ‌های مختلف این دو پروتئین، ساختار واکسن نوترکیب طراحی و خصوصیات آن ارزیابی شد. پروتئین‌های *F* و *HN* در بیماری نیوکاسل آنتی‌ژن‌های خنثی کننده ویروس و همچنین آنتی‌ژن‌های محافظ اصلی هستند (Boursnell et al. 1990; Cosset et al. 1991)، با این حال، سهم هر پروتئین *F* و *HN* در پاسخ آنتی‌بادی سرم و میزان ایمنی محافظ به وضوح مشخص نبود. ویروس نیوکاسل حاوی دو گلیکوپروتئین غشایی است، پروتئین پیوست ویروس هماگلوتینین-نورآمینیداز *HN* و پروتئین همجوشی *F* که در سطح خارجی ویروس به‌صورت برجستگی هایی مانند

سنبله شکل می گیرند. پروتئین *HN* مسئول اتصال ویروس به گیرنده‌های حاوی اسید سیالیک در سلول میزبان است. گلیکوپروتئین‌های *HN* و*F* از نظر عفونت و بیماری زایی ویروس مهم هستند (Nagy et al. 1991). پروتئین‌های *HN* و *F* پا سخ‌های آنتی‌بادی خنثی کننده ویروس تولید می‌کنند و آنتی‌ژن‌های محافظ هستند (Boursnell et al. 1990; Cosset et al. 1991). همچنین در مطالعه ای دیگری نشان داده شده است که پروتئین *F* باعث ایجاد ایمنی محافظتی در برابر ویروس نیوکاسل در جوجه ها می‌شود(Meulemans et al. 1988). و علاوه بر آن پروتئین *HN* از پرندگان در برابر چالش این ویروس محافظت می‌کند(Boursnell et al. 1990; Nagy et al. 1991) ، همچنین نشان داده شده است که آنتی‌بادی های مونوکلونال پروتئین *F* ، ویروس نیوکاسل را بهتر از آنتی‌بادی های مونوکلونال پروتئین *HN* خنثی می‌کنند(Russell 1988).

در ساختار واکسن‌های نوترکیب پیوند دهنده‌ها یکی از قسمت‌های اجتناب‌ناپذیر واکسن‌های چند اپی توپ با نقش ساختاری و عملکردی می‌باشند(Le-Barillec et al. 2005). پیوند دهنده‌ها انواع مختلفی دارند که در این تحقیق از یک مورد از آنها استفاده شده است. AAY و KK، به‌عنوان یک اتصال‌دهنده انعطاف‌پذیر برای اتصال اپی توپ‌ها به یکدیگر استفاده شد .این امر باعث شد که این سازه قابلیت انعطاف و تحرک کافی را داشته باشد(Argos 1990; Chen et al. 2013).

گیرنده‌های آنتی‌ژن‌ها یکی دیگر از ساختارهای مهم در پروسه طراحی واکسن هستند که در این تحقیق بر اساس مطالعه انجام شده توسط ژانگ جی و همکاران (۲۰۱۲) ساختار بلوری BF2 * 0401 از هاپلوتیپ B4 همچنین به‌عنوان B13 شناخته می‌شود به‌عنوان گیرنده واکسن نوترکیب انتخاب شد. سنجش‌های اتصال به پپتید نشان می‌دهد که در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که، BF2 * 0401 می‌تواند انواع بیشتری از پپتیدها را از آنچه در سطح سلول‌های B4 یافت می‌شود، متصل کند(Zhang et al. 2012). تجزیه و تحلیل‌های مختلف سیستم ایمنی نشان داده‌اند که اپی توپ‌های انتخابی به شدت به MHC I، MHC II و سلول‌های B خطی وابسته هستند و می‌توانند پاسخ سیستم ایمنی هومورال و سلولی را تحریک کنند. بر اساس مطالعه‌ای که توسط عثمان و همکاران در ۲۰۱۶ انجام شد بر اساس پروتکل ابزار پیش‌بینی و تحلیلی (IEDB-AR) اپی توپ سلول B، اپی توپ سلول T کمکی و اپی توپ CTL از پروتئین *HN* سویه‌های پرخطر ویروس نیوکاسل پیش‌بینی شد. سپس اپی توپ‌های CTL به عنوان کاندیداهای واکسن انتخاب شدند. هم‌پوشانی بین اپی توپ‌های سلول T کلاس (B-F) MHC I و MHC II (B-L)نشان‌دهنده احتمال ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی از طریق هر دو مسیر MHC کلاس I و II به‌ویژه هم‌پوشانی بین ^{548}ISNTLFGEF^{556} و ^{546}AEISNTLFG^{554} می‌باشند (Osman et al. 2016).

در روش in silico با بررسی مناطق اپیتوپیک بالقوه و محافظت شده از هماگلوتینین-نورآمینیداز (HN) و گلیکوپروتئین‌های همجوشی(F) برای القا پاسخ‌های ویروس نیوکاسل چند اپی توپ می‌تواند مناسب باشد.

پیش‌بینی‌های اپی توپ نشان داد که ساختار فرضی می‌تواند اپی توپ‌های سلول B و T را که به دلیل قرارگیری در قسمت‌های مجزا از سازه یعنی سر، ساقه و مناطق تکرار شده معروف به HRA و HRB که انتظار پاسخ ایمنی بالایی دارند، را القا کند (Motamedi et al. 2014).

با توجه به رشد روزافزون روش‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیک، فرصت مناسبی برای تجزیه و تحلیل و طراحی ایمونوژنها فراهم شده است تا با کمترین هزینه و در مدت زمان کوتاه به نتایج مطلوب در زمینه طراحی واکسن برسید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این واکسن نوترکیب می‌تواند به‌عنوان یک کاندید در درمان پیشگیرانه بیماری نیوکاسل در نظر گرفته شود. با این حال، قابل‌ذکر است که مطالعات بیشتری در مورد عملکرد دقیق این واکسن در طیور لازم است تا بتوان از واکسن به طور رسمی استفاده کرد.

سپا سگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از خانم دکتر خدیجه نصیری به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

References

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.

Alexander DJ, Bell JG, Alders RG (2004) A technology review: Newcastle disease, with special emphasis on its effect on village chickens.

Argos P (1990) An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. J Mol Biolog 211, 943-958.

Arnon R, Ben-Yedidia T (2003) Old and new vaccine approaches. Int Immunopharmacol 3, 1195-1204.

Awan MA, Otte M, James A (1994) The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. Avian Pathol 23, 405-423.

Boursnell M, Green P, Samson A et al. (1990) A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge NDV. Virol 178, 297-300.

Chen X, Zaro JL, Shen W-C (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev 65, 1357-1369.

Collins M, Bashiruddin J, Alexander D (1993) Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch Virol 128, 363-370.

Colovos C, Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Sci 2, 1511-1519.

Cosset F-l, Bouquet J-F, Drynda A et al. (1991) Newcastle disease virus (NDV) vaccine based on immunization with avian cells expressing the NDV hemagglutinin-beuraminidase glycoprotein. Virol 185, 862-866.

Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I (2013) AllerTOP-a server for in silico prediction of allergens. In: BMC bioinformatics. BioMed Central. pp. 1-9.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A et al. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The proteomics protocols handbook, 571-607.

Gotoh B, Sakaguchi T, Nishikawa K et al. (1988) Structural features unique to each of the three antigenic sites on the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. Virol 163, 174-182.

Janson G, Zhang C, Prado MG et al. (2017) PyMod 2.0: improvements in protein sequence-structure analysis and homology modeling within PyMOL. Bioinformatic 33, 444-446.

Le-Barillec K, Magalhaes JG, Corcuff E et al. (2005) Roles for T and NK cells in the innate immune response to Shigella flexneri. J Immunol 175, 1735-1740.

Lee Y-J, Sung H-W, Choi J-G et al. (2008) Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. J Vet Sci 9, e301.

Lovell SC, Davis IW, Arendall III WB et al. (2003) Structure validation by Cα geometry: ϕ, ψ and Cβ deviation. Protein 50, 437-450.

María R, Arturo C, Alicia JA et al. (2017) The impact of bioinformatics on vaccine design and development. InTech, Rijeka, Croatia.

Meulemans G, Letellier C, Gonze M et al. (1988) Newcastle disease virus f glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. Avian Pathol 17, 821-827.

Motamedi MJ, Amani J, Shahsavandi S et al. (2014) In silico design of multimeric HN-F antigen as a highly immunogenic peptide vaccine against Newcastle disease virus. Int J Pept Res Ther 20, 179-194.

Nagy E, Krell P, Dulac G et al. (1991) Vaccination against Newcastle disease with a recombinant baculovirus hemagglutinin-neuraminidase subunit vaccine. Avian Dis 15, 585-590.

Naohiro K, Masahiro N, Mitsuru O et al. (1994) Protective effect of individual glycoproteins of Newcastle disease virus expressed in insect cells: the fusion protein derived from an avirulent strain had lower protective efficacy. Virus Res 32, 373-379.

Osman MM, ElAmin EE, Al-Nour MY et al. (2016) In silico design of epitope based peptide vaccine against virulent strains of hn-newcastle disease virus (NDV) in poultry species. IJMCR: Int J Curr Multidiscip Stud 4.

Permin A, Pedersen G, Riise J (2001) Poultry as a tool for poverty alleviation: Opportunities and problems related to poultry production at village level. In: ACIAR proceedings. ACIAR; 1998. pp. 143-147.

Peters B, Sidney J, Bourne P et al. (2005) The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. Immunogenet 57, 326-336.

Russell P (1988) Monoclonal antibodies in research, diagnosis and epizootiology of Newcastle disease. In: Newcastle disease. Springer. pp. 131-146.

Saha S, Raghava G (2006) AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. Nucleic Acids Res 34, W202-W209.

Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ (2016) Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. Int Immunol 28, 329-338.

Vajda S, Yueh C, Beglov D et al. (2017) New additions to the C lus P ro server motivated by CAPRI. Protein 85, 435-444.

Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acid Res 35, W407-W410.

Yang J, Zhang Y (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. Nucleic Acid Res 43, W174-W181.

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.

Zhang J, Chen Y, Qi J et al. (2012) Narrow groove and restricted anchors of MHC class I molecule BF2* 0401 plus peptide transporter restriction can explain disease susceptibility of B4 chickens. J Immunolog 189, 4478-4487.