مقاله پژوهشی

مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی
مرکز تحقیقات انفورماتیک پزشکی
دوره ششم شماره دوم. ص ۱۵۱-۱۴۰، ۱۳۹۸

آنالیز و طراحی پیشرفته واکسن کُبرا (آنتی‌ژن وسیع‌الطیف بهینه شده با روش‌های محاسباتی) برای پروتئین Bm86 معدی کنه‌های *آنولاتوس* و *میکروپولوس* جنس *ریپی‌سفالوس*

غلامرضا کریمی[۱]، محمدمهدی رنجبر[۲]*، نائبعلی احمدی[۳]، سجاد یزدان‌ستاد[۴]

• دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۵ • پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۲۲

مقدمه: گونه‌های کنه *ریپی‌سفالوس* سبب ضررهای اقتصادی قابل‌ملاحظه‌ای در ایجاد بیماری در حیوانات و همچنین انسان می‌شوند. Bm86 که یک پروتئین معدی کاندید واکسن می‌باشد توالی آن در بین جدایه‌های گونه‌های *ریپی‌سفالوس* از نظر جغرافیائی جدا از هم، متغیر و دلیل اصلی کاهش اثربخشی و شکست واکسن‌های نوترکیب است.

روش: در این مطالعه بیوانفورماتیکی توالی‌های انگل های *ریپی‌سفالوس میکروپولوس* و *آنولاتوس* استخراج، هم‌ردیف و اصلاح گردیدند. سپس نمودار تغییرپذیری و درخت فیلوژنتیک برای آن‌ها ترسیم شد. سپس گروه‌بندی و علامت‌گذاری تاکسون‌ها جهت طراحی واکسن تکاملی، آنتی‌ژن کُبرا، مرکز درخت و اجدادی صورت گرفت. همچنین بر روی توالی‌های واکسنی کُبرا آنالیزهای مدل‌سازی و آزمون بر همنهی انجام گرفت.

نتایج: در دو گونه *میکروپولوس* و *آنولاتوس*، بیشترین تغییری‌پذیری به ترتیب در حدود آمینواسیدهای ۱۷۷ تا ۱۸۱، ۲۷۰ تا ۲۷۶ و ۳۵۱ تا ۳۵۲ مشاهده گردید. ۶ توالی به عنوان توالی مناسب جهت طراحی واکسن تکاملی و ۱۲ توالی نیز جهت هم‌ردیفی مجدد و بدست آوردن توالی مورد توافق جهت طراحی آنتی‌ژن کُبرا استفاده گردید. از سوی دیگر توالی مربوط به *ریپی‌سفالوس آنولاتوس* در شاخه‌های خواهری بوده و بیشتر به یکدیگر شبیه بودند تا به توالی‌های BM86 *ریپی‌سفالوس میکروپولوس*، به جزء توالی ADQ19687. توالی‌های انتخابی جهت طراحی واکسن بر مبنای مرکز درخت و اجدادی نیز به ترتیب از توالی‌های AJE29931، AJE29932 و ATW75472 و توالی‌های ATW5476، ADM86722، ACZ55133 معرفی شدند.

نتیجه‌گیری: واکسن ضد کنه‌ای مبتنی بر روش کُبرا برای Bm86 می‌توانند وسیع‌الطیف‌تر، مقرون به صرفه‌تر و جایگزین بهتری در مقایسه با واکسن‌های نوترکیب فعلی باشند.

کلید واژه‌ها: کنه *ریپی‌سفالوس*، *میکروپولوس*، *آنولاتوس*، واکسن، کُبرا

• **ارجاع:** کریمی غلامرضا، رنجبر محمدمهدی، احمدی نائبعلی، یزدان‌ستاد سجاد. آنالیز و طراحی پیشرفته واکسن کُبرا (آنتی‌ژن وسیع‌الطیف بهینه شده با روش‌های محاسباتی) برای پروتئین Bm86 معدی کنه‌های *آنولاتوس* و *میکروپولوس* جنس *ریپی‌سفالوس*. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۸؛ ۶(۲): ۵۱-۱۴۰.

۱. دکتری تخصصی انگل‌شناسی، استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲. دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی، استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. دکتری تخصصی انگل‌شناسی، استاد، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. دکتری تخصصی میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
* **نویسنده مسئول:** کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
• **شماره تماس:** ۳۴۵۷۰۰۳۸ - ۰۲۶ • **Email:** mm.ranjbar.phd@gmail.com

مقدمه

کنه‌های *ریپی‌سفالوس* یا با نام قدیمی آن *بوافیلوس* (*Rhipicephalus or Boophilus*)، کنه‌هایی خون‌خوار اجباری می‌باشند که می‌توانند سبب ایجاد خسارات اقتصادی سالانه میلیون دلاری و انتقال برخی از عوامل بیماری‌زا از جمله بابزیا و آناپلاسما به دام‌ها گردند [۱،۲]. منطق توسعه واکسن مبتنی بر آنتی‌ژن کنه‌ای بر اساس این مشاهده است که در معرض قرارگیری مجدد گونه‌های به‌خصوصی از حیوانات به گزش کنه منجر به عدم توانایی کنه در به دست آوردن موفق غذای خونی در این حیوانات می‌شود، پدیده‌ای که تحت عنوان ایمنی کنه (Tick immunity) نامیده می‌شود [۳]. این حیوانات افزایش حساسیت را به کنه بعد از گزش‌های مکرر نشان می‌دهند و به‌طور ناقص محافظتی را علیه پاتوژن‌های با عامل کنه‌ای نشان می‌دهند [۴].

نتایج بسیار مؤثری از واکسن نوترکیب Bm86 در کاهش تعداد *Rhipicephalus microplus* به واسطه عدم تغذیه (غذاخوری) موفق انگل به دست آمده است که منجر به عدم وزن‌گیری مناسب و کاهش در oviposited eggs می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده این واکسن‌ها می‌توانند انتقال گونه‌های مختلف بابزیا (به‌خصوص گونه bovis) را کاهش دهند [۵]. از این‌رو تنها واکسن تجاری ضد وکتوری ثبت شده علیه کنه‌ها در بین واکسن‌های دامپزشکی، بر اساس آنتی‌ژن Bm86 معدی *Rhipicephalus microplus* (Boophilus microplus) است [۵،۶]. این واکسن به صورت TickGARD Plus در بازار در دسترس است و در آمریکای لاتین استفاده می‌شود [۷]. همچنین مطالعات نشان داده است که واکسن مبتنی بر Bm86 بر روی غذاخواری در سایر گونه‌های مختلف کنه نظیر: *Rhicephalus annulatus*، *Rhipicephalus decoloratus*، *Hyalomma anatolicum* و *Hyalomma dromedarii* در گاو ایمن شده مؤثر بوده است؛ اما مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که این موفقیت در *R. microplus* در کنترل جمعیت *Ixodes ricinus*، *Amblyomma cajennense*، *Ambylomma variegatum* و *Rhipicephalus appendiculatus* مؤثر نبوده است [۳]. امروزه در فرآیند تولید واکسن به دلایل بی‌خطر بودن، آلرژنسیتی و تمرکز پاسخ ایمنی از واکسن‌های نوترکیب استفاده می‌گردد که قادر به تولید پاسخ ایمنی علیه پاتوژن مورد نظر به‌طور اختصاصی باشند [۸].

با در دست داشتن اطلاعات کافی، دسترسی به فن‌آوری‌های جدید شناسایی، الگوریتم‌های طبقه‌بندی شده و ابزارهای محاسبه‌ای که مناطقی با تغییر بالا را در پروتئین بررسی کرده و توالی مورد توافق را پیش‌بینی می‌کنند، تقریباً با احتمال بالا می‌توان توالی یا توالی‌های حاصل برآیند دسته داده توالی‌ها را در پروتئین مورد نظر شناسایی کرد و به آنتی‌ژن‌ها و سوش‌های واکسن مناسب دست یافت.

واکسن‌های متعددی را می‌توان با روش‌های ایمونوانفورماتیک طراحی کرد و از آن جمله می‌توان به واکسن‌های پلی‌توپی (پلی‌اپی‌توپیک، اپیتوپیک یا پپتیدهای متصل شده به یکدیگر) (mosaic vaccines)، واکسن‌های موزائیکی (mosaic vaccines)، واکسن‌های پپتیدی (peptide vaccines) آنتی‌ژن‌های وسیع‌الاثر بهینه‌سازی شده با روش‌های محاسباتی یا به اختصار کُبرا (computationally optimized broadly reactive antigen(s) (COBRA)-based design)، سیستم طراحی واکسن تکاملی (evolutionary vaccine design system) و شجره‌ای و ... نام برد [۹]. روش طراحی واکسن مبتنی بر اصول کُبرا یکی از جدیدترین و قوی‌ترین روش‌های طراحی واکسن مخصوصاً برای اجرام و پروتئین‌های متغیر و بسیار متغیر می‌باشد که در سال‌های اخیر توانسته به توسعه مناسبی دست یابد [۱۰].

طراحی واکسن با توالی‌های متمرکز شده (Centralized sequences) با سه روش صورت می‌گیرد که عبارت‌اند از: روش مرکز درخت یا (center-of-the-tree)COT، روش اجدادی (ancestral) (نزدیک‌ترین جد مشترک یا the most recent common ancestor) و روش مورد توافق (Consensus) (معمول‌ترین آمینواسیدی که در هر پوزیشن یافت می‌شود) یا روش کُبرا [۱۰] در بین این سه روش مورد توافق نتایج بهتری را ارائه می‌دهد و در این مطالعه از این روش جهت طراحی و مهندسی پروتئین آنتی‌ژن نوترکیب کُبرا با قابلیت استفاده به‌صورت ایده‌آل جهت واکسن و مصارف تشخیصی استفاده شد.

روش

جمع‌آوری داده‌ها، دسته‌بندی توالی‌ها و هم‌ردیفی توالی‌ها

با روش‌های بیوانفورماتیکی توالی‌های کامل مربوط به پروتئین Bm86 از پایگاه داده (National center for

NCBI (Biotechnology Information به نشانی (http://ncbi.nlm.nih.gov/) برداشت و دسته‌بندی شدند. سپس با استفاده از الگوریتم Clustal w2 سرور T-coffee مورد هم‌ردیفی قرار گرفته و نتایج در برنامه Bioedit 7.7.9 مورد پیرایش و اصلاحات مورد نیاز قرار گرفت. این اصلاحات شامل ترمیم نقاط واجد X (مشخص نبودن آمینواسید در آن نقطه) و کامل نبودن برخی نقاط و گپ‌ها بود. همچنین توالی‌ها هم طول گردیده، توالی‌های ناقص کوتاه حذف و نقاط با هم‌ردیفی مبهم اصلاح گردیدند.

ترسیم منحنی‌های تغییرپذیری

از روش The Shannon entropy analysis، Simpson index و Wu-Kabat variability coefficient جهت ارزیابی تغییرپذیری و یافتن نواحی جهش‌پذیر/محافظت‌شدگی در میان توالی استفاده شد [۱۱]. در این میان روش شانون نسبت به دو روش دیگر واجد حساسیت بیشتری است. سرور این آنالیز تغییرپذیری توالی در یک هم‌ردیف چندگانه توالی را با استفاده از معیارهای تغییر اندازه‌گیری می‌کند.

پیشگویی نواحی گلیکوزیلیشن و سیگنال پپتید

برای پیشگوئی نواحی N گلیکوزیلیشن (N-Linked Glycosylation Sites) که از تغییرات بعد از ترجمه بر روی پروتئین‌ها بوده و در ایمن‌زایی پروتئین نقش بسزائی دارد، از امکانات Server NetNGlyc 1.0 استفاده گردید. گلیکوزیلیش این نواحی پروتئین می‌تواند به‌طور مؤثری در افزایش پاسخ ایمنی اختصاص (آنتی‌بادی‌ها و در مسیر پردازش MHC کلاس ۱) مؤثر باشد [۱۲].

ترسیم درخت فیلوژنی، گروه‌بندی، تفسیر و انتخاب توالی‌ها

توالی‌های هم‌ردیف شده در برنامه MEGA X (آخرین نسخه برنامه MEGA یا MEGA 8) وارد شده، با استفاده از روش آماری حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood-ML)، آزمون درخت Bootstrap و تکرار ۱۰۰، مدل جایگزینی انتخابی (Jones-Taylor-Thornton) JTT مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین در پیرایش پی از درخت قسمت‌های واجد گپ و ناقص به صورت حذف کامل بود [۱۳].

در ادامه گزینه انتخابی استنتاج درخت (Tree Inference) در میان روش‌های Heuristic ML، Nearest-NNI(Nearest-Neighbor-Interchange) بوده و درخت اولیه برای ML با روش NJ/BioNJ انتخاب شد.

سپس از هر خوشه از درخت توالی به نمایندگی جهت طراحی نسل کُبرا انتخاب شد. همچنین با تفسیر درخت توالی‌های مناسب ساخت واکسن‌های تکاملی و شجره‌ای (سوش‌های اجدادی و سوش‌های نوظهور) انتخاب شدند.

به دست آوردن توالی مورد توافق (Consensus)

توالی هم‌ردیف و پیرایش شده با استفاده از روش حد آستانه (Threshold) و اکثریت (Majority) تکرار مورد ارزیابی قرار گرفته و توالی مورد توافق برای سرخوشه‌های انتخابی در درخت فیلوژنی به دست آمد.

مدل‌سازی، بهینه‌سازی انرژی و اعتبارسنجی ساختار سه بعدی پروتئین

(Basic Local Alignment Search Tool) BLASTP [۱۴] و PSI-BLAST [۱۵] در پایگاه مرجع پروتئین (PDB- Protein Data Bank) جهت انتخاب بهترین الگو (توالی همولوگوس) و طراحی ساختار سه‌بعدی (3D) BM86 به روش مدل‌سازی همسان (هومولوژی مدلینگ) استفاده می‌گردد. در انتخاب الگو معیارهایی نظیر حد تمیز (resolution) پایین‌تر از ۳ انگستروم مربوط به کریستالوگرافی اشعه ایکس، R-value پایین‌تر از ۰/۳، شباهت بالای ۳۵ درصد الگو با توالی مورد مطالعه و E-value پایین اعمال می‌شود. همچنین که توالی مورد هدف (توالی آلل) و الگوی انتخاب شده واجد هم‌ردیفی ساختاری مناسبی با ارزش‌های RMSD (Root-mean-square deviation) پایین باشند. به‌کارگیری این نکات سبب افزایش اعتبار و اطمینان‌پذیری مدل‌سازی می‌شود. بعد از هم‌ردیفی نزدیک‌ترین توالی پیدا شده این توالی با توالی مورد تحلیل در این مطالعه مورد هم‌ردیفی قرار گرفته و از برنامه Phyre جهت ساخت ساختار سه‌بعدی و فضایی از روی الگو استفاده گردید. جهت نمایش ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، بهینه‌سازی انرژی و اعتبارسنجی آن‌ها از امکانات برنامه‌های Chimera UCSF و SwissPdbviewer 4 (http://spdbv.vital_it.ch) بهره‌گیری شد.

پروتئین اولیه و پروتئین ثانویه حاصل از توالی مورد توافق (Consensus) با استفاده از امکانات برنامه اینترنتی I-TASSER مورد مدل‌سازی قرار گرفته سپس با برنامه Chimera 1.11 از نظر ساختاری و بهینه‌سازی انرژی بررسی گردید. سپس این دو ساختار مدل‌سازی شده از نظر اعتبارسنجی از پلات راماچاندران (Ramachandran plot) مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۶].

سوپرایمپوز (برهم نهی، Superimpose) پروتئین‌های اولیه با آنتی‌ژن‌های کُبرا

جهت افزایش موفقیت و جلوگیری از مشکلات ساختاری پروتئین طراحی شده، در این مرحله دو ساختار مدل اولیه و ثانویه پروتئین می‌بایست با هم جور شده و مورد هم‌ردیفی فضایی (سه‌بعدی) یا Superimpose قرار گیرند. این امر جهت بررسی واقعی بودن و عدم انحراف پروتئین از ماهیت اصلی و تغییرات فضایی ناخواسته به‌واسطه تغییر غیرهدفمند توالی از نظر خمش و صاف‌شدگی و زیرساختار دوم آلفا، بتا و کویل است. از امکانات برنامه Chimera UCSF جهت این امر استفاده شد.

پیشگویی اپی‌توپ‌های فضایی

در این مرحله اپی‌توپ‌های فضایی برای پروتئین اولیه و آنتی‌ژن کُبرا با استفاده از سرورهای DiscoTope، Ellipro و BCpro و اپی‌توپ‌های تکرار شده در چند سرور به‌عنوان اپی‌توپ‌های نهایی انتخاب شدند.

نتایج

پلات‌های تغییرپذیری یافتن نواحی جهش‌پذیر و محافظت شده در مطالعات حاضر، بر اساس الگوی روش شانون H >۰/۲، D> ۰/۶ در سیمپسون و variability>۱۵ در کابات–وو به‌عنوان مناطق متغیر و مناطق کمتر از این آسته به‌عنوان مناطق نیمه حفاظت شده و محافظت شده فرض می‌شوند (شکل ۱). پلات کابات–وو کمترین حساسیت را داشته و پلات‌های شانون و سیمپسون نتایج نسبتاً مشابه‌تری از تغییرپذیری را به یکدیگر نشان می‌دهند. بر این اساس پروتئین BM86 در دو گونه میکروپولوس و آنولاتوس از کنه ریپی‌سفالوس، بیشترین تغییرپذیری (Semi hyper variability) در حدود آمینواسیدهای ۱۷۷ تا ۱۸۱، ۲۷۰ تا ۲۷۶ (متغیرترین) و ۳۵۱ تا ۳۵۲ مشاهده گردید. البته به‌طورکلی قسمت‌های متغیر توالی‌ها در دامنه ۷۷ تا ۳۷۴ و ۵۶۰ تا ۶۳۵ و برخی ناحیه‌های منفرد نظیر ۴۰۰، ۴۷۶، ۵۴۹ تا ۵۰۲، ۵۲۸ قرار داشته‌اند. به این نواحی متغیر و ثابت در طراحی واکسن می‌بایست با نگاه ویژه توجه کرد. در واقع نواحی متغیر نواحی چالش‌زایی در ساخت واکسن است که طراحی آنتی‌ژن مشکل آن نواحی را مرتفع می‌سازد.

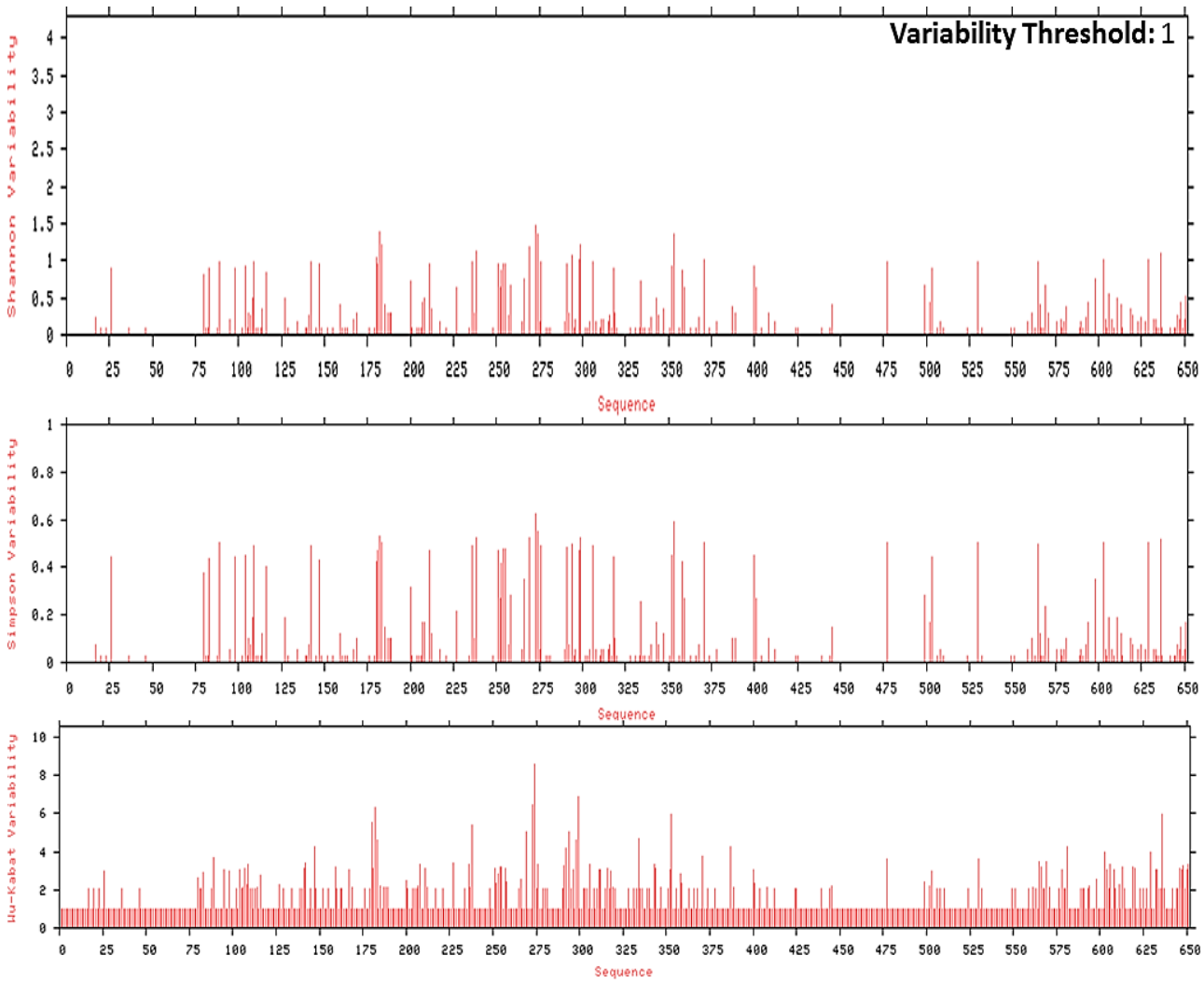
فیلوژنی مولکولی در شناسایی سوش واکسینال و آنتی‌ژن کُبرا

در درخت (شکل ۲) ۵ خوشه قابل تفریق وجود دارد که در این میان بر اساس اطلاعات قابل تفسیر درخت، به نظر می‌رسد توالی‌های با شماره دسترسی AJE29931، AJE29932، ACZ55133، ABY58965، ATW75467، ADM86722 (که با علامت ▲ مشخص شده‌اند) و همچنین AAW72947 (توالی نوظهور این پروتئین) به‌عنوان توالی مناسب جهت طراحی واکسن تکاملی و توالی‌های با شماره دسترسی ADQ19687، AJE29929، AJE29926، AJE29934، AJE29951، AJE29941، ATW75472، ADQ19680، ACA57829، AAW31854، AAU95763 و AAW72958 (مشخص شده با علامت ●) جهت هم‌ردیفی مجدد و به دست آوردن توالی مورد توافق جهت طراحی آنتی‌ژن کُبرا استفاده گردید. همچنین توالی مربوط به *ریپی‌سفالوس آنولاتوس* در شاخه‌های خواهری بوده و بیشتر به یکدیگر شبیه بودند تا به توالی‌های BM86 *ریپی‌سفالوس میکروپولوس*، به‌جزء توالی ADQ19687 گونه *میکروپولوس* که از کنه‌های جنوب تگزاس آمریکا جدا شده است.

همچنین جهت طراحی واکسن یا سوش واکسینال بر مبنای مرکز درخت (COT-Center of tree) از توالی‌های AJE29931، AJE29932 و ATW75472 استفاده برد.

همچنین بر اساس طول شاخه از جد مشترک (Common ancestor) می‌توان توالی‌های ATW5476، ADM86722، ACZ55133 و AJE29931 را به عنوان کاندیدهای واکسن یا سوش واکسن اجدادی (ANC-Ancestral) معرفی کرد.

استفاده از درخت فیلوژنی و انتخاب نماینده دسته جهت هم‌ردیفی مجدد و به دست آوردن توالی آنتی‌ژن واکسینال کُبرا جهت کاهش bias به سمت خاصی به سبب تکرر برخی توالی‌های جداسازی از یک ناحیه به خصوص و ... است.



شکل ۱: ترسیم پلات تغییرپذیری با استفاده از روش‌های شانون، سیمپسون و کابات-وو برای پروتئین BM86. محور X شماره آمینواسیدهای پروتئین را مشخص می‌کند و محور Y نمایانگر نتایج آنایز تغییرپذیری پلات شانون، سیمپسون و کابات-وو است

به دست آوردن آنتی‌ژن مورد توافق واکسن کُبرا

پس از هم‌ردیفی مجدد آنتی‌ژن واکسن کُبرا انتخابی به‌دست آمده با ترکیب روش حدآستانه و اکثرت تکرار برای گونه *آنولاتوس* جهت ساخت واکسن به‌ترتیب زیر بود:

>Consensus Seq. *Rhipicephalus annulatus*

MRGIALFVAAVSLIVECTAESSICSDFGNEFCRNAECEVVPGAEDDFVCKCPRDNMYFNAAEKQCE
YKDTCKTRECSYGRCVESNPSKASCVCEASDDLTLQCKIKNYATDCRNRGGTAKLRTDGIGATCDC
GEWGAMNKTTRNCVPTTCLRPDLTCKDLCEKNLLQRDSRCCQGWNSPKCSAADSYCSPGSPKGPD
GQCKDACTKEAGFVCKHGCRSTDKAYECTCPRGFTVAEDGITCKSIPYTGGCTaEQKQTCRPTEsCR
VHtGKVLCECPWNQHLVGDKCIGDCVdNKCHEEFTDCGVYMNRQSCYCPWKSRKPGPNVNINECL
LNEYYYTVSFTPNISLDSDHCDWYEDRVLEAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDIKARLIAEKPLSNHVLR
KLQCEHPIGEWCMMYPKLLIKKNSATEIEEENLCDSLLKNQEAAYKGQNKCVKVDNLFWFQCADG
YTTTYEMTRGRLRRSVCKAGVSCNENEQLECTNKGQICVYENGKANCQCPPDTKPGEIGCIERTTC
NPKEIQECQDKKLECVYKNHKAECKCPDDRECSREPAKDSCSEEDNGKCQSSGQRCVMENGnAVC
KEKSEATTAATATTKAKnkDPDPGKSSAAAVSATGLLLLLAATSVTAASL

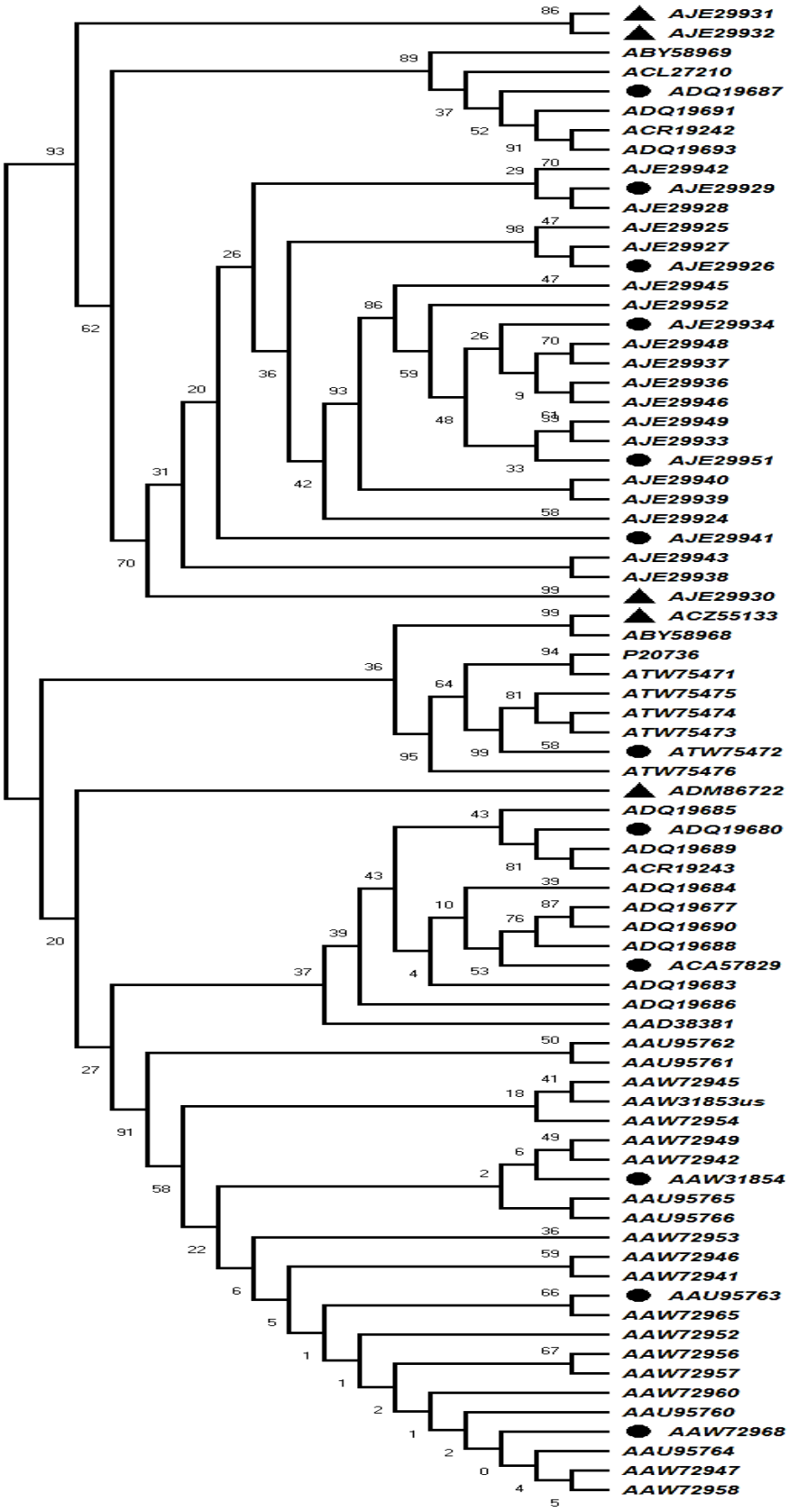
همچنین توالی انتخابی در هم‌ردیفی مجدد آنتی‌ژن واکسن کُبرا انتخابی به دست آمده با روش ترکیبی حد آستانه و اکثرت برای گونه *میکروپولوس* به ترتیب زیر بود:

>Consensus Seq. *Rhipicephalus microplus*
MRGIALFVAAVSLIVECTAESSICSDFGNEFCRNAECEVVPGAEDDFVCKCPRDNMYFNAAEKQCE
YKDTCKTRECSYGrCVeSNPSKaSCVCEASDdLTLQCkIKNDyATDCRNrGGTAKLRTDGFIGATCDC
GEWGAMNkTTRnCVPTTCLRPDLTCKDLCEKNLLQRDSRCCQGWntanCSAAPPADSYCSPGSPKGP
DGQCKNACrTKEAGFVCKHGCRSTDKAYECTCPrGfTVAEDGITCKSIsYtvsCTVEQKQTCRpTEdCR
VqkGtVLCECPWNQHLVGDtCIsDCVdkKCHEEFmDCGVYMNRQSCyCPWKSRKPGPNVNINECLLN
EYYYTVSFTPNISlnSDHCDWYEDRVLEAIRTsIGKEVFKVEILNCTQDIKARLIAEKPLSNHVLRKLQ
ACEHPIGEWCMMYPKLLIKKNSATEIEEENLCDSLLKNQEAAYKGQNKCVKVDNLFWFQCADGYT
TTYEmTRGRLRRSVCKAGVSCNENEQLECAdKGQICVYENGKANCQCPPDTKPGEIGcIERTTCNPK
EIQECQDKKLECVYKNHKAECKCPDgHECSREPAKDSCSEEDNGKCQSSGQRCVMENGKAVCKeK
SEATTAATTTTKAKDKDPDPGKSSaAAVSATgLLLLLAATSVTAASL

گلیکوزیلیشن، مدل‌سازی سه‌بعدی و اعتبارسنجی Bm86

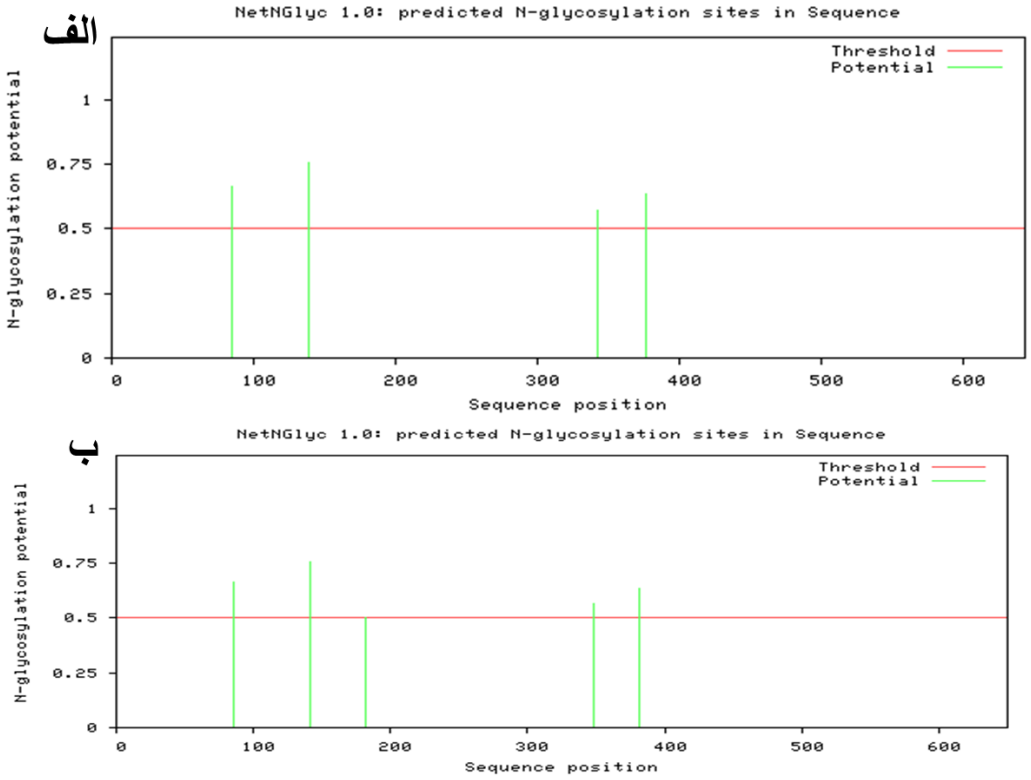
نواحی N گلیکوزیلیشن با استفاده از امکانات (N-Linked Glycosylation Sites) و NetNGlyc 1.0 Server محاسبه گردید. نتایج در شکل‌های ۳ (الف و ب) ارائه شد. همان‌طور که مشخص است، چهار ناحیه در N–گلیکوزیلیشن آنتی‌ژن کُبرا *ریپی‌سفالوس آنولاتوس* وجود داشته که قوی‌ترین در آمینواسید ۱۳۹(NKTT) با سه امتیاز مثبت و ضعیف‌ترین در ناحیه ۳۴۲ (NISL) بود (شکل ۳ الف).

در پروتئین اولیه در یکی از توالی‌های دسته داده نیز پنج ناحیه در N–گلیکوزیلیشن در پروتئین BM86 ریپی‌سفالوس *میکروپولوس* وجود داشت که قوی‌ترین در آمینواسید ۱۴۱ (NKTT) با سه امتیاز مثبت و ضعیف‌ترین در ناحیه (NCSA) ۱۸۲، (NISL)۳۴۸ و ۳۸۲ (NCTQ) بود (شکل ۳ ب).



شکل ۲: آنالیز فیلوژنی مولکولی با به‌کارگیری روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood method).

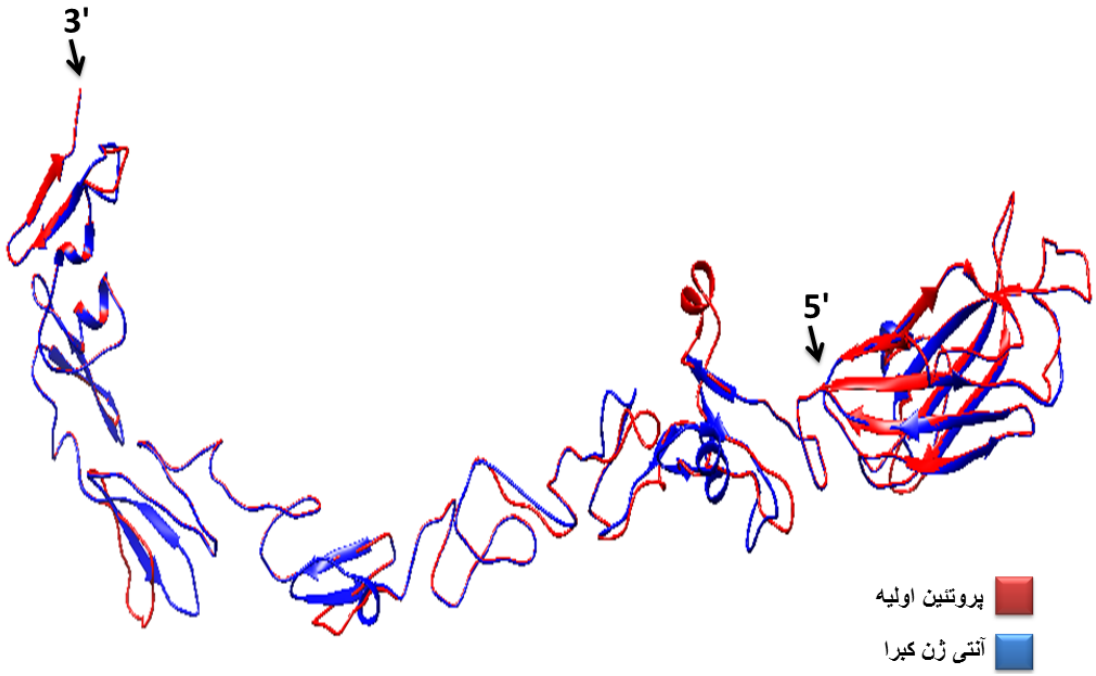
تاریخچه تکامل با استناد به روش حداکثر درست‌نمایی مبتنی بر مدل ماتریکس JTT کشیده شده است. درخت واجد log درست‌نمایی حداکثری (۵۳۲۴/۵۹-) به تصویر کشیده شده است. درصد درخت، که به‌معنی تاکسون‌های مرتبط با هم خوشه‌بندی شده می‌باشد، در نزدیکی شاخه‌ها نشان داده شد. درخت‌های اولیه برای جستجوی heuristic به‌طور خودکار با به کارگیری الگوریتم‌های اتصال همسایه (Neighbor-Join) و BioNJ از یک ماتریکس جفتی فاصله‌ای با استفاده از مدل JTT تخمین زده شد و سپس توپولوژی با درست‌نمایی log ارجح‌تر انتخاب شد. ۶۴۸ آمینواسید طول توالی انتخاب شده از ۷۷ توالی در دسته داده جهت ترسیم درخت بود.



شکل ۳: نتایج آنالیز N-گلیکوزیلیشن آنتی‌ژن کُبرا *ریپی‌سفالوس آنولاتوس (الف)* و *میکروپولوس* (ب) در منحنی

مدل‌سازی، اعتبارسنجی و سوپرایمپوز ساختار سه‌بعدی پروتئین اولیه و ثانویه کُبرا

پروتئین انتخابی جهت راماچاندران پلات برای پروتئین اولیه *ریپی‌سفالوس میکروپولوس* ۹۰/۷٪ موفقیت در مدل‌سازی بود و در مورد آنتی‌ژن کُبرا ۸۳/۸٪ بود. در هر دو مدل حدود ۶۰٪ آمینواسیدهای با ۱۰۰٪ اطمینان با برنامه Phyre مدل‌سازی شده‌اند. برای جلوگیری از دست‌یابی به پروتئین غیرطبیعی از نظر ساختار، متفاوت از نظر ساختار کلی با پروتئین اولیه و با فولدها نامتعارف سوپرایمپوز ساختار اولیه و آنتی‌ژن طراحی و مهندسی شده کُبرا برهم‌نهی (سوپرایمپوز) دو ساختار صورت گرفت. ارزیابی میزان تطابق دو ساختار (و در واقع هم‌ردیفی ساختاری) بر اساس انحراف جذر میانگین مربعات RMSD برای اسکلت اصلی پروتئین (عموماً کربن‌ها) است که هر چه این عدد بر اساس انگستروم کوچک‌تر باشد، نشان‌دهنده نزدیکی بیشتر دو ساختار است. RMSD در مقایسه بین این دو پروتئین ۰/۴ در ۳۲۴ اتم برهم‌نهی شد که نشان می‌دهد با این که تفاوت آمینواسیدی بین این دو پروتئین وجود دارد؛ اما شباهت کلی ساختاری نیز بین آن‌ها حاکم است و ساختار و فولدینگ آنتی‌ژن واکسن کُبرا قابل اعتماد می‌باشد (شکل ۴).



شکل ٤: برهم‌نهی (سوپرایمپوز) دو ساختار مدل شده پروتئین اولیه (به رنگ قرمز) *ریپی‌سفالوس میکروپولوس* و آنتی‌ژن کُبرا (به رنگ آبی) طراحی شده آن

بحث و نتیجه‌گیری

کنه‌ها به‌عنوان انگل‌های خارجی خون‌خوار انسان، حیوانات اهلی و وحشی شناخته می‌شوند که علاوه بر ایجاد خسارات مستقیم نظیر: کاهش وزن، کم‌خونی، مسمومیت و فلجی، در دام‌های مختلف، قادر به انتقال اجرام بیماری‌زای عفونی (نظیر ویروسی، ریکتزیایی و انگلی) به موجودات مختلف می‌باشند. امروزه با توجه به مضرات مصرف مواد شیمیایی، از جمله ایجاد مقاومت و باقی‌مانده‌های سموم، توجه خاصی به واکسیناسیون دام‌ها علیه کنه‌ها معطوف گردیده است [۱۷]. بی‌شک تهیه یک واکسن مناسب در گرو انتخاب پروتئین مناسب و کارا می‌باشد که بتواند به قدر کافی سیستم ایمنی را علیه آلودگی کنه‌ای تحریک نماید [۱۸]. ژنوم کنه *بوافیلوس* جزء نخستین ژنوم‌های کنه‌ای بوده که توالی‌یابی شده و با تکنولوژی‌های نوین تهیه واکسن مورد پایش قرار گرفته است [۱۸،۱۹]. همچنین پروتئین‌های کنه *بوافیلوس* جهت مصارف مختلف نظیر اهداف ساخت دارو و واکسن مورد توجه تحقیقات بیوانفورماتیک و ایمونوانفورماتیک قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های روده‌ای کنه اشاره کرد [۱۸،۲۰].

نسل واکسن‌های کُبرا (به‌عنوان زیرمجموعه‌ای از روش توالی‌های متمرکز شده) سبب تحریک پاسخ آنتی‌بادی قوی، دوام‌پذیر و وسیع‌الطیف به‌عنوان واکسن Universal به خصوص در مورد پروتئین‌های بسیار متغیر شد و این روش ابتدا برای پروتئین‌های ویروس‌های بسیار متغیر (نظیر آنفولانزا، ایدز و هپاتیت C) معرفی گردید [۱۰،۲۱،۲۲]. از این رو در این مطالعه برای اولین بار در پروتئین‌های متغیر انگلی از این تکنولوژی طراحی و مهندسی استفاده شد و برای پروتئین BM82 دو کنه *ریپی‌سفالوس میکروپولوس* و *آنولاتوس* که گونه اخیر بومی ایران است با موفقیت به طراحی آنتی‌ژن و سوش واکسن نمود. نتایج گلیکوزیلیش حاکی گلیکوزیلیش طبیعی و مناسب پروتئین جهت افزایش ایمونوژنسیتی آنتی‌ژن است.

در مطالعه حاضر از ابزارهای گوناگون و پیشرفته ایمونوانفورماتیک و بیوانفورماتیک مقایسه دو پروتئین یا پروتئین‌ها بر اساس توالی (Sequence)، مستقل از توالی و بر اساس ساختار (Structure) یا بر اساس سایر خصوصیات/ویژگی‌ها (Other properties/features) استفاده گردید. در روش مستقل از توالی و بر اساس ساختار سه‌بعدی پروتئین بر هم‌نهی یا سوپرایمپوز شده و پروتئین‌ها به‌صورت بدنه‌های سخت (Rigid bodies) در نظر گرفته شد و عملکرد امتیازدهی کمی و بهینه‌سازی بر اساس RMSD (فواصل میان اتم‌های باقی‌مانده‌ها) است و تنها باقی‌مانده‌های هم‌ردیف شده جهت برهم‌نهی استفاده می‌شوند [۲۳]. در

واکسن‌های طراحی شده بر مبنای کُبرا این مرحله بررسی جهت نیل به آنتی‌ژن با ساختار فضائی نزدیک به پروتئین اولیه و عدم به‌هم‌ریختگی فولدینگ‌های طبیعی پروتئین ضروری است.

تا به حال چندین تحقیق ایمونوانفورماتیکی بر روی پروتئین‌های ایمونوژن انگل‌ها نظیر: پروتئین TSOL18 در کرم *Taenia solium*، پروتئین غشاء رأسی (Apical Membrane Antigen1(AMA-1) در انگل *Plasmodium vivax*، پروتئین انکوسفر EG95 در سستودهای *Echinococcus granulosus* و *Echinococcus Multilocularis* صورت گرفته است [۱۸]. با این وجود تا به حال از روش‌های توالی متمرکز شده و به‌خصوص نسل کُبرا جهت طراحی واکسن استفاده نشده است.

در کل نتایج این تحقیق می‌تواند سبب توسعه و شناخت واکسن‌های نوترکیب پیشرفته در مبارزه با اجرام بیماری‌زای انگلی شده و راه‌های نوینی را در استفاده از تکنولوژی‌های جدید بیوانفورماتیک در پیشگیری از بروز بیماری و شناخت سوش‌های واکسینال جهت ساخت واکسن مهیا سازد.

تعارض منافع

این پژوهش توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حمایت و پشتیبانی گردیده است. همچنین فاقد هر گونه تعارض منافع احتمالی می‌باشد.

References

1. Taheri M, Nabian S, Ranjbar M, Mazaheri Nezhad R, Gerami Sadeghian A, Sazmand A. Study of vitellogenin in Boophilus annulatus tick larvae and its immunological aspects. Trop Biomed 2014;31(3):398-405.

2. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology 2004;129 Suppl:S3-14. doi: 10.1017/S0031182004005967

3. Coumou J, Wagemakers A, Trentelman JJ, Nijhof AM, Hovius JW. Vaccination against Bm86 Homologues in Rabbits Does Not Impair Ixodes ricinus Feeding or Oviposition. PLoS One 2015;10(4):e0123495. doi: 10.1371/journal.pone.0123495.

4. Narasimhan S, Deponte K, Marcantonio N, Liang X, Royce TE, Nelson KF, et al. Immunity against Ixodes scapularis salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs Borrelia transmission. PLoS One 2007;2(5):e451. doi:10.1371/journal.pone.0000451

5. Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from Boophilus microplus. J Immunol 1989;143(4):1346-51.

6. Gough JM, Kemp DH. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick Boophilus microplus by immunogold labeling. J Parasitol 1993;79(6):900-7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.06.002

7. de la Fuente J, Almazan C, Canales M, Perez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim Health Res Rev 2007;8(1):23-8. doi:10.1017/S1466252307001193

8. Ranjbar MM, Gupta SK, Ghorban K, Nabian S, Sazmand A, Taheri M, et al. Designing and modeling of complex DNA vaccine based on tropomyosin protein of Boophilus genus tick. Appl Biochem Biotechnol 2015;175(1):323-39. doi: 10.1007/s12010-014-1245-z.

9. Ranjbar MM, Ataei Kachooei S, Ahmadi NA, Ghorban K, Motedayen MH, Motamed N. Novel Antibody informatics knowledge in therapeutic-drug discovery and diagnosis. Veterinary Researches & Biological Products 2018;31(1):2-15. doi: 10.22092/vj.2017.110460.1306

10. Giles BM, Ross TM. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets. Vaccine 2011;29(16):3043-54. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.100.

11. Keyvani H, Ahmadi NA, Ranjbar MM, Ataei Kachooei S, Ghorban K, Dadmanesh M. Immunoinformatics Study of Gp120 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype CRF35_AD Isolated from Iranian Patients. Archives of Clinical Infectious Diseases 2016; 11(4). doi: 10.5812/archcid.36270

12. Wolfert MA, Boons GJ. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. Nat Chem Biol. 2013;9(12):776-84. doi: 10.1038/nchembio.1403.

13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol 2018;35(6):1547-49. doi: 10.1093/molbev/msy096.

14. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215(3):403-10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

15. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997;25(17):3389-402. doi:10.1093/nar/25.17.3389

16. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by

Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. Proteins 2003;50(3):437-50. doi:10.1002/prot.10286

17. Willadsen P. Anti-tick vaccines. Parasitology. 2004;129 Suppl:S367-87. doi: 10.1017/S0031182003004657

18. Ranjbar MM, Nabian S, Taheri M, Nikbakhat GR, Nikpei A. Immunoinformatic Survey of Boophilus Tick Tropomyosin Protein. Journal of Veterinary Research 2014; 69(4): 335–45.

19. Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, et al. CattleTickBase: an integrated Internet-based bioinformatics resource for Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Int J Parasitol 2012;42(2):161-9. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.11.006.

20. Ranjbar MM, Ahmadi NA, Ghorban K, Ghalyanchi Langeroudi A, Dadmanesh M, Amini H-R, Sedighi Moghaddam B. Immnoinformatics: Novel view in understanding of immune system function, databases and prediction of immunogenic epitopes. Koomesh 2015; 17(1): 18–26. Persian

21. Wong TM, Allen JD, Bebin-Blackwell AG, Carter DM, Alefantis T, DiNapoli J, et al. Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Elicits Hemagglutination Inhibition Antibodies against a Panel of H3N2 Influenza Virus Cocirculating Variants. J Virol 2017;91(24). pii: e01581-17. doi: 10.1128/JVI.01581-17.

22. Carter DM, Darby CA, Johnson SK, Carlock MA, Kirchenbaum GA, Allen JD, et al. Elicitation of Protective Antibodies against a Broad Panel of H1N1 Viruses in Ferrets Preimmune to Historical H1N1 Influenza Viruses. J Virol 2017;91(24). pii: e01283-17. doi: 10.1128/JVI.01283-17.

23. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. Methods Mol Biol 2012;857:231-57. doi: 10.1007/978-1-61779-588-6_10.

Original Article

Journal of Health and Biomedical Informatics
Medical Informatics Research Center
2019; 6(2): 140-151

Analysis and Professional Designing of COBRA (Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen) Vaccine for Bm86 midgut Protein of *R. microplus* and *R. annulatus* Ticks

Ranjbar Mohammad Mehdi[1]*, Karimi Gholamreza[2], Ahmadi Naebali[3], Yazdansetad Sajjad[4]

• **Received:** 25 Jan, 2019 • **Accepted:** 12 May, 2019

Introduction: The cattle tick *Rhipicephalus* spp. causes significant economic losses due to diseases in animals and human. Bm86 is a midgut protein and vaccine candidate, which its sequences among the isolates of *Ripsephalus* spp are geographically separated, variable, and are the main reason for reducing effectiveness, and subsequently, the failure of the recombinant vaccines.
Method: In this bioinformatics study, the sequences of *R. microplus* and *R. annulatus* were retrieved, aligned, and edited. Then, the variation plot and phylogenetic tree were constructed. Afterwards, grouping and taxa marking for designing evolutionary vaccine, COBRA antigen, center of tree and ancestral were done. Also, over COBRA vaccine sequences, modeling analysis and superimpose test were done.
Results: In both *R. microplus* and *R. annulatus*, the most variable region were residues 177-181, 270-276, and 351-352, respectively. 6 sequences were selected as appropriate sequences for design of evolutionary vaccine, and 12 for the realignment of and achieving sequences for design of COBRA antigen. On the other hand, *R. annulatus* sequences were in sister branches and more similar to each other compared to Bm86 protein sequences in *R. microplus* except ADQ19687. The sequences selected for vaccine design based on the center of tree and ancestral, were AJE29931, AJE29932, and ATW75472, and ATW5476, ADM86722, ACZ55133 sequences, respectively.
Conclusion: Anti-tick COBRA-based vaccines of Bm86 could be more cost-effective and better alternative with broader spectrum, compared to the commonly used recombinant vaccines.

Keywords: *Rhipicephalus, Microplus, Annulatus, Vaccine, COBRA*

• **Citation:** Ranjbar MM, Karimi GR, Ahmadi N, Yazdansetad S. Analysis and Professional Designing of COBRA (Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen) Vaccine for Bm86 midgut Protein of *R. microplus* and *R. annulatus* Ticks. Journal of Health and Biomedical Informatics 2019; 6(2): 140-51. [In Persian]

1. Ph.D in Parasitology, Assistant Professor in Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Ph.D in Immunology, Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Ph.D in Parasitology, Professor, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Ph.D in Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

***Correspondence**: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
• **Tel:** 026-34570038 • **Email:** mm.ranjbar.phd@gmail.com